



Ministério da Educação e do Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Farmacologia



NELSON FERNANDO QUALLIO MARQUES

**AVALIAÇÃO TERATOLÓGICA DA EXPOSIÇÃO DA *Morinda citrifolia* Linn EM
RATAS WISTAR**

Curitiba - PR

2009

NELSON FERNANDO QUALLIO MARQUES

**AVALIAÇÃO TERATOLÓGICA DA EXPOSIÇÃO DA *Morinda citrifolia* Linn EM
RATAS WISTAR**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de concentração Toxicologia Ambiental, Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter.

Curitiba
2009

AGRADECIMENTOS

Ao meu criador, pela vida, pelas bênçãos e pela proteção.

Ao orientador professor Dr. Paulo Roberto Dalsenter, pela orientação, apoio, incentivos, confiança e amizade.

Ao professor Dr. Francisco J. R. Paumgartten, pesquisador chefe do Laboratório de Toxicologia Ambiental da Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro, Rosangela R. de Cavalho, Sergio Kuryama, pela acolhida, incentivo, confiança e dedicação na colaboração para a realização deste trabalho.

A professora Dra Eliane Dallegrave pela orientação na padronização da técnica de clareamento e coloração dos fetos.

Ao amigo Luiz do biotério da UFPR, pela colaboração e ajuda no fornecimento de animais utilizados nos experimentos deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, pela ajuda e companheirismo.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia Lindacir, Nair, Silvia e Sr. Jorge, pela dedicação e amizade.

Ao CNPq, pela ajuda financeira.

A Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. Aos colegas de trabalho, Roque Perinazzo, Sandrely Rocha do Centro Hospitalar de Reabilitação.

Ao meu falecido avô, que sempre me direcionou e incentivou quanto aos estudos.

Aos meus pais, pela presença em todos os momentos de minha vida, pela educação, orientação, e valores para os quais carregarei por toda minha vida.

A minha amada esposa, que firme permaneceu ao meu lado, que vivenciou todos os momentos bons e ruins desta jornada, obrigado pela ajuda e dedicação.

Dedico, a todos que de alguma forma ajudaram e vivenciaram este trabalho.

À Ana Paula minha esposa;

Aos meus pais Juliano e Teresinha;

Ao meu avô Juliano (*in memoriam*);

Por todo amor e dedicação direcionados a minha pessoa.

“...Por mais perfeito que seja alguém entre os filhos dos homens,
se lhe falta a sabedoria que vem de ti, de nada valerá...”

Sabedoria 9: 6

A única coisa que nenhum indivíduo
pode tirar-lhe é o
conhecimento.

Autor desconhecido.

RESUMO

O uso de plantas medicinais para tratamento de doenças origina-se da antiguidade e se estende até os dias atuais. Segundo a Organização Mundial da Saúde 80% da população dos países subdesenvolvidos utilizam plantas medicinais para a recuperação da saúde. Popularmente conhecida como noni, derivados da *Morinda citrifolia*, vêm sendo comercializados e consumidos pelo mundo para tratamento de diversas enfermidades, apoiados nas propriedades descritas pelos povos polinésios que a utilizam há mais de 2000 anos. Entre as indicações mais populares encontram-se o tratamento de alergia, infecção bacteriana, artrite, asma, câncer, depressão, diabetes e hipertensão. O marketing de vendas do produto é fundamentado nas propriedades fitoterápicas, sendo que muitas delas ainda não possuem comprovação científica. Em suas propagandas os comerciantes do extrato e do suco do noni não restringem o consumo por mulheres grávidas. Assim, levando em consideração a fragilidade deste estado fisiológico aliado a falta de estudos que descrevam segurança, o consumo dos derivados do noni torna-se um risco para gravidez. Estudos iniciais realizados com animais de laboratório descrevem que o extrato de noni possa interferir no sistema endócrino, que o suco de noni possui a capacidade antiangiogênica, assim como inibitória da enzima ciclooxigenase (COX). Desta maneira, o objetivo deste estudo foi avaliar se o suco ou o extrato do noni possuem atividade teratogênica. O suco da *M. citrifolia* foi concentrado através do processo de liofilização, e depois ambos, extrato ou suco concentrado foram dissolvidos em água destilada como veículo (5 mL/kg). As doses de extrato 7, 30 e 300 mg /kg/ dia, ou suco 0,4, 2,0 e 20,0 mL /kg/ dia foram administradas por gavagem a ratas Wistar nos dias 7-15 de prenhez. Em paralelo utilizou-se ácido valproico (300mg/kg/dia) como controle positivo para teratogenicidade. Foram investigados número de implantes, reabsorções e malformações fetais. Embora a administração da *Morinda citrifolia* não tenha induzido toxicidade materna nas doses testadas, tanto o extrato quanto o suco foram capazes de induzir retardo na ossificação dos fetos avaliados. Estes achados sugerem que a administração do extrato ou suco de noni durante a organogênese pode induzir efeitos adversos sobre o desenvolvimento normal dos fetos da linhagem Wistar. Assim derivados do noni precisam de mais estudos com a finalidade de garantir o uso correto, adequado e seguro durante a gestação.

Palavras chave: Toxicologia reprodutiva, ratos Wistar, plantas medicinais, *Morinda citrifolia*, anomalias fetais, teratogenicidade, retardo na ossificação.

ABSTRACT

The use of medicinal plants for treatment of disease date ancient of seniority up to the present day. According to World Health Organization (WHO), 80% of the population lives in underdeveloped countries use medicinal plants for the recovery of health. Popularly known as noni, *Morinda citrifolia* derivatives have been marketed and consumed around the world for treatment of various diseases supported in the properties described by Polynesian peoples that use more than 2000 years. Among the most popular indications are the treatments of: allergy, bacterial infection, arthritis, asthma, cancer, depression, diabetes and hypertension. Marketing sales of the product is based on the properties phytotherapeutic, and many of them do not yet have scientific proof. The trades advertising about the extract and juice do not limit the consumption by pregnant women. Thus taking into account the fragility of this physiological state allied to the lack of studies describing security, the consumption of derived from noni becomes a risk to pregnant women. Initial studies conducted with laboratory animals describe that noni extract can interfere with the endocrine system, noni juice has the ability antiangiogenic as well as inhibitory of the enzyme cyclooxygenase (COX). Through the mechanisms of enzyme inhibition (COX) and inhibition of growth of veins and arteries by the extract and juice of noni may have teratogenic activity. Thus, the aim of the study was to assess whether the extract of the noni juice and has teratogenic activity. The juice of *Morinda citrifolia* was concentrated through the process of lyophilization, and then both extract and juice concentrate were dissolved in distilled water as vehicle (5 ml / kg). These doses of extract: 7, 30, 300 mg / kg / day, and juice: 0.4, 2.0, 20.0 mL / kg / day, were administered by gavage to Wistar rats on days 7-15 of pregnancy. In parallel, the valproic acid (300mg/kg/dia) was used as positive control for teratogenicity. The number of implantation sites, resorptions numbers, fetal weight and skeletal malformation were recorded. Although the data demonstrating that *Morinda citrifolia* was not induce maternal toxicity at the doses tested, both the extract and the juice induced delayed ossification in fetuses. These findings suggest that the administration of the extract or juice noni during organogenesis may induce adverse effects on the normal development of fetuses of Wistar rats. These results suggest that derivatives of noni need more studies in order to ensure the correct use, appropriate and safe.

Keywords: Reproductive toxicity, Wistar rats, medicinal plants, *Morinda citrifolia*, skeletal anomalies, teratogenicity, delayed ossification.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	<i>Morinda citrifolia</i> Linn	15
FIGURA 2	OSSOS SACRAIS FUNDIDOS DE FETOS TRATADOS COM ÁCIDO VALPRÓICO 300 mg/kg/dia (AUMENTO DE SEIS VEZES).....	35
FIGURA 3	SINAIS DE RETARDO NA OSSIFICAÇÃO NO CRÂNIO, OSSOS POBREMENTE CALCIFICADOS (AUMENTO DE SEIS VEZES).	40
FIGURA 4	SINAIS DE RETARDO NA OSSIFICAÇÃO DE VERTEBRAS, OSSOS DA CINTURA PÉVICA E MEMBROS POSTERIORES (AUMENTO DE SEIS VEZES).....	41
FIGURA 5	DISTÂNCIA ENTRE AS LÂMINAS PALATINAS AUMENTADAS (AUMENTO DE 20 VEZES).....	43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	POSSÍVEIS EFEITOS ADVERSOS QUE PODEM OCORRER COM O USO DE PLANTAS MEDICINAIS.	8
TABELA 2	GRUPOS DE RATAS TRATADAS DURANTE O PERÍODO DA ORGANOGENESE.	27
TABELA 3	DADOS DA CESÁREANA DE RATAS PRENHAS TRATADAS VIA ORAL COM EXTRATO (7, 30, 300 mg/kg) OU SUCO (0.4; 2; 20 mL/kg) DE <i>Morinda citrifolia</i> Linn OU ÁCIDO VALPRÓICO (300 mg/kg) OU VEÍCULO (5 mL/kg).....	33
TABELA 4	VARIÁVEIS MATERNAIS DE RATAS PRENHAS TRATADAS VIA ORAL COM EXTRATO (7, 30, 300 mg/kg) OU SUCO (0,4; 2; 20 mL/kg) DE <i>Morinda citrifolia</i> Linn OU ÁCIDO VALPRÓICO (300 mg/kg) OU VEÍCULO (5 mL/kg).....	34
TABELA 5	RETARDO DE OSSIFICAÇÃO EM OSSOS FETAIS DE RATAS TRATADAS VIA ORAL COM EXTRATO (7, 30, 300 mg/kg) OU SUCO (0.4; 2; 20 mL/kg) DE <i>Morinda citrifolia</i> Linn OU ÁCIDO VALPRÓICO (300 mg/kg) OU VEÍCULO (5 mL/kg).....	36
TABELA 6	ALTERAÇÕES E VARIAÇÕES DE OSSOS FETAIS DE RATAS TRATADAS VIA ORAL COM EXTRATO (7, 30, 300 mg/kg) OU SUCO (0.4; 2; 20 mL/kg) DE <i>Morinda citrifolia</i> Linn OU ÁCIDO VALPRÓICO (300 mg/kg) OU VEÍCULO (5 mL/kg).....	38

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	-Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CIT	- Centro de Informações Toxicológicas
DOU	- Diário Oficial da União
EDSTAC	- <i>Endocrine Disrupters Screening and Testing Advisor Committee</i>
ESCAP	- <i>European Scientific Cooperative on Phytotherapy</i>
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
OECD	- <i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PR	-Paraná
RDC	-Resolução da Diretoria Colegiada
SINITOX	-Sistema Nacional de Informações Toxicológicas
US EPA	- <i>United States - Environmental Protection Agency</i>
WHO	- <i>World Health Organization</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

BHT	-Di-terc-butil-metil-fenol
CCl ₄	-Tetracloroeto de carbono
COX	-Ciclooxigenase
G0	-Primeiro dia da prenhez
FGF-2	- Fator de crescimento de fibroblastos 2
IFN	-Interferon
IL-1	- Interleucina 1
KOH	-Hidróxido de potássio
KH ₂ PO ₄	-Fosfato de potássio monobásico
Linn	-Linnaeus
LPO	-Peroxidação lipídica
NO	-Óxido nítrico
NOAEL	-No observed adverse effect level
SAR	- Radical anion superóxido
TNF	- Fator de necrose tumoral
TNJ	- <i>TAHITIAN NONI® Juice</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Por cento

® - Marca registrada

p - Nível de significância estatística

mg - Miligrama

mL - Mililitro

nº - Número

n - Número de animais

kg - Quilograma

US\$ - *United States dollar*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO LITERATURA	5
2.1 PLANTAS MEDICINAIS	5
2.1.1 Plantas medicinais e toxicidade	7
2.2 LEGISLAÇÃO	11
2.2.1 Legislação brasileira	12
2.3 <i>Morinda citrifolia</i> Linn.	15
2.3.1 Classificação botânica	15
2.3.2 Histórico da planta <i>Morinda citrifolia</i> Linn	16
2.3.3 Composição química	17
2.3.4 Farmacocinética	18
2.3.5 Atividades biológicas reconhecidas	18
2.3.6 Estudos Toxicológicos com a <i>Morinda citrifolia</i>	21
2.3.6.1 Toxicidade aguda	21
2.3.6.2 Toxicidade crônica	21
2.3.6.3 Toxicidade reprodutiva	21
2.3.6.4 Estudos teratológicos	22
2.3.7 Situação regulamentar da <i>Morinda citrifolia</i> no Brasil	23
3. JUSTIFICATIVA	24
4. OBJETIVOS	25
4.1 OBJETIVO GERAL	25
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
5. MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1 ANIMAIS	26
5.2 ACASALAMENTO	26
5.3 <i>Morinda citrifolia</i> e ÁCIDO VALPRÓICO	27
5.4 DOSES UTILIZADAS E TRATAMENTO	27
5.5 CESÁREANAS	28
5.6 VARIÁVEIS MATERNAS	29
5.7 VARIÁVEIS FETAIS	30
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
7. RESULTADOS	32
7.1 DADOS DAS CESÁREANAS	32
7.2 VARIÁVEIS MATERNAS	32
7.2 VARIÁVEIS FETAIS	35
8. DISCUSSÃO	44
9. CONCLUSÃO	52
10. REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas com finalidades terapêuticas há milhares de anos. Desde a antiguidade o homem se utiliza das propriedades medicinais das plantas no combate as doenças. A partir da década de 1980, foram desenvolvidos novos métodos de isolamento de substâncias ativas, tornando-se possível identificar substâncias em amostras complexas como os extratos vegetais. Desta maneira, ressurgiu o interesse por compostos de origem vegetal que pudessem ser utilizados como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006). Mesmo com a evolução da ciência e da tecnologia, e o aparecimento de drogas sintéticas, grande parte da população mundial utiliza-se das plantas medicinais e de medicamentos fitoterápicos como forma alternativa para a recuperação da saúde (WHO, 2000). A organização mundial da saúde estima que 158 milhões da população de adultos nos Estados Unidos utilizaram à medicina complementar e 17 bilhões de dólares foram gastos com produtos derivados de plantas em 2000 (WHO, 2003b).

As plantas medicinais desempenham papel importante na medicina, na indústria e na economia, uma vez que podem fornecer fármacos extremamente importantes e difíceis de serem obtidos através da síntese química. As fontes naturais fornecem compostos que podem ser levemente modificados, tornando-os mais eficazes ou menos tóxicos. Diante da grande importância dos fitoterápicos, verifica-se que vários países da Europa (dentre eles Alemanha e França), estão intensificando esforços para unificar a legislação que regulamenta a comercialização dos fitoterápicos. Entretanto, nos Estados Unidos, a grande maioria das preparações que possuem derivados de plantas medicinais pode ser comercializada livremente por ser classificada como suplementos nutricionais. Esta classificação faz com que não seja necessário submeter dados de segurança e eficácia destes produtos ao órgão regulamentador *Food and Drug Administration* (FDA) (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

Apesar da crescente importância dos medicamentos fitoterápicos, relativamente poucos estudos foram realizados a fim de comprovar sua eficácia e segurança, sendo que muitas plantas ainda são utilizadas com base somente no seu uso popular bem estabelecido. Embora a ocorrência de efeitos indesejáveis das

plantas medicinais muitas vezes seja menor do que as drogas sintéticas bem definidas, experimentos clínicos têm revelado que efeitos adversos também estão correlacionados com a utilização de plantas medicinais. Desta maneira estudos toxicológicos bem controlados para provar a sua segurança são necessários (CALIXTO, 2000).

No Brasil, o órgão responsável pela regulamentação dos medicamentos fitoterápicos é a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Nos últimos anos através da Portaria nº 6 de 1995, a agência estabeleceu prazos para que as indústrias farmacêuticas apresentassem dados de eficácia e segurança dos medicamentos fitoterápicos. Através da RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) nº 17 de 2000, e a RDC nº 48 de 16 de março de 2004, atualmente em vigor, estabeleceu critérios para o registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil (BRASIL, 2004, 2000). Assim para a obtenção de registro e por consequência, a industrialização e comercialização de produtos provenientes de plantas no Brasil, são necessárias a apresentação de dados de segurança e eficácia.

Mundialmente difundido e popularmente conhecido como noni, a *Morinda citrifolia* tem sido utilizada durante séculos na medicina tradicional dos povos Polinésios. Segundo o uso tradicional, praticamente toda a planta (raiz, folhas, frutos) pode ser utilizada no tratamento de doenças, o que impulsionou a elaboração de vários produtos comerciais. Assim derivados do noni podem ser adquiridos e consumidos sob a forma de suco, extrato, chá, cosméticos, *shake* entre outros.

Até 2004, o grande marketing comercial do noni no Brasil, refletia o papel econômico que esta planta representa para os países que a produzem. Atualmente, a comercialização dos produtos da *Morinda citrifolia*, tidos como suplemento alimentar, está proibida. No entanto, vários produtos que possuem o noni em sua composição são comercializados livremente no Brasil.

Baseados nos usos dos povos polinésicos, vários estudos presentes na literatura tiveram como objetivo estudar as propriedades terapêuticas do noni, incluindo as atividades antiinflamatórias, antioxidante e antitumoral (WANG e col, 2002a). Apesar da literatura científica sobre essa espécie vegetal ser extensa, especialmente em relação aos possíveis efeitos farmacológicos e usos terapêuticos, a quantidade de publicações que avaliaram sua segurança é limitada. Os estudos

toxicológicos são limitados e considerados insuficientes para comprovar a segurança dos produtos (BRASIL, 2007a).

Recentes relatos na literatura associaram casos de hepatotoxicidade com o uso do suco de noni em humanos. A capacidade anti-estrogênica, inibidora da enzima ciclooxigenase (COX), e também da atividade anti-angiogênica *in vitro*, também foram descritas para o suco de noni. Substâncias que apresentam a capacidade de inibir o crescimento de veias e artérias, produzir hepatotoxicidade, assim como inibir a enzima COX, podem interferir no desenvolvimento fetal na gestação.

Considerando que gestantes culturalmente recorrem ao uso de plantas medicinais, riscos para a mãe e para o feto têm tornado constante a preocupação com o uso de fitoterápicos neste grupo populacional.

Os comerciantes do noni não contra indicam o consumo do produto por mulheres grávidas mesmo com a ausência de evidências claras de segurança. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a existência de possíveis interferências durante o período gestacional crítico para a organogênese.

2. REVISÃO LITERATURA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

Existem registros da utilização de plantas medicinais pelo homem desde a antiguidade. O homem através da observação da natureza aprendeu a utilizar os recursos disponíveis para sua alimentação, moradia, defesa, práticas religiosas e saúde (NEVES, 2001). Essas observações deram origem a um processo intuitivo que caracterizou os primeiros experimentadores que faziam ensaios com diversas plantas com o intuito de discernir quais possuíam e quais não possuíam efeitos medicinais (ALONSO, 1998).

Evolutivamente a arte de curar passou por numerosas etapas, porém, torna-se difícil delimitá-las com exatidão, já que a medicina e o uso de plantas estiveram por muito tempo associados às práticas mágicas, místicas e ritualísticas. A utilização com finalidade de curar doenças estava associada com o misticismo, uma vez que se acreditava que os males antigos, na maioria das vezes, eram castigos ou produtos da ira dos deuses. Mesmo assim, o homem precisou aprender a conhecer as plantas certas para cada finalidade.

Em registros escritos no Egito Antigo, relatados no Livro dos Vivos, podem-se observar descrições de empregos e propriedades de extratos puros e misturados, que tinham sua origem nas plantas, e eram utilizadas no tratamento de diferentes doenças. Mais adiante na história, no livro sagrado Talmud hebraico, foi deixado extensa parte reservada ao estudo das plantas. Nesta parte do livro existem descrições das propriedades, maneira correta de cultivo e indicações do modo de uso de espécies vegetais (NEVES, 2001).

Com o desenvolvimento da química orgânica, foi possível obter substâncias puras através do isolamento de princípios ativos de plantas, entre elas, a digoxina e a morfina (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006). Mas com a evolução da medicina alopática a partir da segunda metade do século XX, os fármacos sintéticos assumiram os cenários mundiais. Mesmo assim, paralelamente foram registrados variados procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais, mantendo a tradição do uso de plantas. O conhecimento popular, associado com a existência de obstáculos no acesso aos centros de saúde, à obtenção de atendimento, à

realização de exames e aos medicamentos, contribui até os dias atuais para a utilização das plantas pelas populações dos países em desenvolvimento (VEIGA Jr, 2005).

Em boletim publicado em 2001 a Organização Mundial da Saúde (WHO), descreveu que nas últimas décadas observou-se a revalorização do emprego de preparações fitoterápicas (WHO, 2001). Observando esta tendência, alguns grupos farmacêuticos passaram a desenvolver esforços voltados para o aprimoramento de medicamentos fitoterápicos bem como sua produção em escala industrial com o objetivo de explorar um possível mercado com elevada lucratividade. Assim, ficou claro que o novo avanço dos medicamentos fitoterápicos caracteriza-se pela busca de produção em escala industrial. Na África, por exemplo, 80% da população dependem do uso destes medicamentos, os quais representam terapias alternativas frente ao alto custo dos fármacos sintéticos (ASCHWANDEN, 2001). Para a população alemã em 1997, as plantas medicinais eram utilizadas para tratar resfriados (66%), gripe (38%), doenças do trato digestivo ou intestinal (25%), dores de cabeça (25%), insônia (25%), úlcera estomacal (36%), nervosismo (21%), bronquite (15%), doenças de pele (15%), fadiga e exaustão (12%). Nesse mesmo país, foi verificado que a automedicação com preparações à base de plantas medicinais era muito comum (CALIXTO, 2000).

O mercado mundial de medicamentos fitoterápicos é de US\$ 43 bilhões por ano. Somente nos Estados Unidos da América, este mercado representa US\$ 5 bilhões por ano, sendo o setor de mais rápido crescimento no mercado farmacêutico norte-americano (ASCHWANDEN, 2001). Na Alemanha no ano de 1997, se consumia metade dos extratos vegetais comercializados em toda a Europa (cerca de US\$ 3,5 bilhões do total de US\$ 7 bilhões, ou US\$ 42,90 *per capita*) (CALIXTO, 2000). No Brasil as estatísticas indicam que os laboratórios privados crescem a uma taxa de aproximadamente 20% ao ano, com relação a sua capacidade produtiva de fitoterápicos (BRASIL, 2001).

O Brasil participa expressivamente do mercado internacional de plantas medicinais. Segundo dados da Carteira de Comércio Exterior, o Brasil exportou no ano de 1984 um valor estimado de US\$ 20 milhões em produtos naturais obtidos de plantas. A exploração de recursos medicinais no Brasil, no entanto, está relacionada, em grande parte, à coleta extensiva e extrativa de material silvestre. Apesar da

exportação de várias espécies medicinais na forma bruta ou de seus subprodutos, poucas espécies atingiram o ponto para cultivo. O fato é mais marcante quando consideramos as espécies nativas, cujas pesquisas básicas são ainda incipientes, não existindo o cultivo em grande escala (NEVES, 2001).

Em todos os países, desenvolvidos ou em desenvolvimento, nota-se o aumento dos apelos da mídia para o consumo de produtos a base de fontes naturais. Para isso os comerciantes prometem saúde e vida longa embasados no argumento de que as plantas têm uso milenar, portanto não oferece riscos a população. Hoje no mercado mundial de fitoterápicos verificam-se, em proporções cada vez mais freqüentes o comércio e uso de plantas medicinais referenciadas pela medicina tradicional hindu e chinesa. Totalmente desconhecidas pelos povos ocidentais, o consumo é incentivado através de propagandas que prometem “benefícios seguros, já que se trata de fonte natural”. Entretanto, a maioria das supostas propriedades farmacológicas anunciadas não possuem validade científica, por não terem sido investigadas, ou por não terem tido suas ações farmacológicas comprovadas em testes científicos pré-clínicos ou clínicos.

2.1.1 Plantas medicinais e toxicidade

O potencial tóxico dos fitoterápicos não é novo e em continentes como o Asiático e Africano em que o uso de plantas é extenso, os perigos já são conhecidos, de maneira, que alguns fitoterápicos são cuidadosamente utilizados. Para eles não é surpresa a associação dos efeitos tóxicos com o consumo de alguns espécimes vegetais. Assim mesmo sendo de origem vegetal, o uso deve ser racionalizado. Estudos mostram que as plantas medicinais possuem substâncias potencialmente tóxicas podendo causar uma simples alergia ou manifestar reações tóxicas mais severas.

Alguns efeitos tóxicos podem estar associados à presença de certas constituintes das plantas (Tabela 01). Os efeitos hepatotóxicos de apiol, safrol, lignanas e alcalóides pirrolizidínicos; a ação tóxica renal que pode ser causada por espécies vegetais que contêm terpenos e saponinas e alguns tipos de dermatites, causadas por espécies ricas em lactonas sesquiterpênicas e produtos naturais do tipo furanocumarinas (CAPASSO, 2000).

TABELA 1 - POSSÍVEIS EFEITOS ADVERSOS QUE PODEM OCORRER COM O USO DE PLANTAS MEDICINAIS.

Nome popular	Nome científico	Efeito adverso	Possível constituinte responsável
Arnica	<i>Arnica montana L.</i>	Gastroenterite, Dermatite.	Sesquiterpenos Lactonas
Boldo	<i>Peumus boldus</i>	Irritação renal	Óleo essencial
Alho	<i>Allium sativum</i>	Náusea, Vômito, Diarréia, Dermatite	Desconhecido
Camomila	<i>Anthemis nobilis</i>	Reações alérgicas, Vômitos	Sesquiterpenos Lactonas
Ginkgo	<i>Ginkgo biloba</i>	Dores de cabeça, Perturbações gastrintestinais	Desconhecido
Ginseng	<i>Panax ginseng</i>	Hipertensão, Diarréia, Insônia, Sangramento vaginal	Desconhecido
Mate	<i>Ilex paraguariensis</i>	Distúrbios hepáticos	Xantinas
Ruibarbo	<i>Rheum officinale</i>	Desconforto abdominal, desequilíbrio eletrolítico, coloração da urina alterada (vermelha)	Antraquinonas
Hypericum	<i>Hypericum perforatum</i>	Fotodermatite	Hipericina
Confrei	<i>Symphytum officinale</i>	Hepatotoxicidade Fotodermatite	Alcalóides

FONTE: MODIFICADO DE CAPASSO, 2000.

Sabe-se que 60% dos casos de intoxicação por plantas tóxicas no Brasil ocorrem com crianças menores de nove anos, e que 80% deles são acidentais (BRASIL, 2007a). Geralmente, casos de intoxicação associados as plantas constituem quadros de toxicidade aguda, como aquele produzido pela planta conhecida popularmente como “comigo ninguém pode” (*Dieffenbachia picta*) (BRASIL, 2007d).

Dados do SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-farmacológicas), órgão ligado ao Ministério da Saúde brasileiro, descrevem que duas mulheres foram a óbito em 2004, devido à intoxicação por plantas (BRASIL, 2007c).

O uso terapêutico também trouxe malefícios conforme relatos da Organização Mundial da Saúde (OMS), que após associar diversos casos de morte ocasionados por cirrose resultante de doença hepática veno-oclusiva, desencadeadas por alcalóides do confrei, condenou o uso desta planta medicinal por via oral (VEIGA Jr, 2005).

A FDA (*Food and Drug Administration*), retirou em fevereiro de 2000 do mercado americano, cinco fitoterápicos de origem chinesa depois da descoberta da existência de níveis perigosos de duas substâncias anti-diabéticas. Em agosto do mesmo ano o mesmo órgão regulador publicou o manual “Guia para a Indústria”, como uma maneira de encorajar a aplicação de boas práticas de fabricação de fitoterápicos (ASCHWANDEN, 2001).

Nos cuidados com a saúde, atenção especial deve ser dada às gestantes. Neste caso, o uso de espécies vegetais deve seguir rigorosamente os mesmos cuidados dos medicamentos alopáticos, uma vez que as substâncias presentes em algumas plantas podem provocar morte intra-uterina ou ainda provocar elevação da atividade uterina causando a expulsão do feto, aborto.

A arruda (*Ruta graveolens*) além de provocar irritação da mucosa bucal e inflamações epidérmicas, pode ainda provocar fortes hemorragias e aborto (HOENE, 1939 citado por VEIGA Jr, 2005). Assim como a sucubá (*Himanthus sucuba*) utilizada no tratamento de úlcera e gastrite, e combate a amebíase. Entre as plantas medicinais que podem causar aborto por estimular a motilidade uterina destacam-se: aloe (*Aloe ferox*), angélica (*Angelica archangelica*), arnica (*Arnica montana*), cânfora (*Cinnamomum canphora*), confrei (*Symphytum officinalis*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), gengibre (*Zingiber officinalis*) e sene (*Cassia angustifolia* e *Cassia acutifolia*). Alguns óleos essenciais também devem ser evitados, como exemplo, os provenientes de bétula (*Betula alba*), cedro (*Cedrela brasiliensis*), erva-doce (*Pimpinella anisum*), jasmim (*Jasminum officinalis*), manjeriço (*Origanum basilicum*), manjerona (*Majorana hortensis*), tomilho (*Thymus vulgaris*), rosa (*Rosa sp.*) e lavanda (*Lavanda angustifolia*). Neste último caso, deve-

se evitar o consumo, especialmente nos primeiros meses de gravidez (DAVIS, 1996 citado por VEIGA Jr, 2005).

Além das ações antiulcerogênica (JORGE, 2004; SOUZA, 1991) e anti-inflamatória (JORGE, 2004), estudos recentes, realizados com ratas prenhas, apontaram o efeito colateral abortivo da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*), planta medicinal de comprovada baixa toxicidade (OLIVEIRA e col, 1991). Extratos hidroalcoólicos dessa planta mostraram-se abortivos por atuarem no período de pré-implantação dos embriões no útero (MONTANARI, 2002).

Almeida e col. (2000), relataram os efeitos tóxicos da planta *Coleus barbatus*, popularmente conhecida pelos brasileiros como boldo ou falso boldo. Ocorreu redução no número de implantes, comprovando suas propriedades abortivas. No mesmo estudo também foi avaliada a existência de possível efeito teratogênico, contudo notou-se apenas redução no número de pontos de ossificação óssea, ou seja, nenhum efeito foi verificado com relação a malformações externas ou viscerais.

Turolla e Nascimento (2006) realizaram um levantamento das informações sobre a toxicidade pré-clínica de dez plantas medicinais comercializadas como medicamentos fitoterápicos no Brasil junto aos principais bancos de dados e fontes públicas de informação: OMS, Comissão E, Conselho Americano de Botânica, Cooperativa Científica Européia em Fitoterapia (ESCOP). As análises das informações das plantas: *Passiflora incarnata*, *Ginkgo biloba*, *Aesculus hippocastanum*, *Plantago ovata*, *Panax ginseng*, *Piper methysticum*, *Valeriana officinalis*, *Hypericum perforatum*, *Cimicifuga racemosa*, *Rhamnus purshiana*, revelaram que pouco se sabe a respeito da toxicidade pré-clínica destas plantas, sendo que os experimentos em animais revelaram baixa toxicidade aguda, subaguda e crônica, e não demonstraram atividade mutagênica ou teratogênica.

Recentemente observa-se o crescimento do número de trabalhos que exploram as possíveis propriedades teratogênica de plantas. Substâncias capazes de aumentar o índice de perdas embrionárias, ou causar aborto, comumente podem induzir malformações fetais (KALTER, 2003). Em 2003, Maruo e col. descreveram que o fruto da planta *Solanum lycocarpum* possui a capacidade de induzir aumento de alterações nas esternébras e aumento de hemorragia nos bulbos olfatórios dos animais.

Estudos realizados com o extrato hidroalcoólico da planta *Lantana câmara* demonstraram que esta planta foi capaz de aumentar a frequência de retardo na ossificação de fetos (MELLO e col., 2005)

Nana e col. (2008) verificaram que o extrato das folhas da planta *Acanthus montanus* foi capaz de induzir redução no tamanho das caldas, redução da massa fetal, retardo de ossificação fetal.

Fenda palatina foi o principal sinal de malformação fetal encontrados experimentalmente por Medeiros e col. (2008) quando administraram as sementes da planta *Mimosa tenuiflora*.

2.2 LEGISLAÇÃO

A OMS define que planta medicinal é “todo ou parte de qualquer vegetal que possui substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que possam servir de precursores para fármacos semi-sintéticos” (WHO, 1998).

Na Alemanha foi estabelecido em 1976 a “Comissão E”, que é responsável pela coleta de dados, avaliação das características de segurança e eficácia dos fitoterápicos. Os parâmetros avaliados são: uso tradicional, constituintes químicos, estudos experimentais de toxicologia, estudos clínicos, relatos médicos de pacientes tratados e estudos adicionais. A partir daquele ano, mais de 4000 tipos de plantas medicinais tem foram submetidas a farmacovigilância e removidos do mercado por causa de importantes efeitos tóxicos para os humanos (KELLER, 1996).

Em 1986 a Agência Canadense de proteção à saúde (HPB, *Health Protection Branch*) constituiu um comitê especial para tratar das normas de registro de plantas medicinais, sendo que o sistema de registro está fundamentado de acordo com o uso popular e dados científicos, em acordo com o guia publicado pela OMS (Guia para Uso Adequado de Ervas Medicinais, 1948-1998). Na França não ocorre distinção para o registro de medicamentos sintéticos ou de origem natural (CALIXTO, 2000).

Nos Estados Unidos da América a lei “Suplementos Dietéticos Ato de Saúde e Educação de 1994” regulamenta a fitoterapia. A fitoterapia não é avaliada pela FDA, pois a finalidade não é a utilização para prevenção, diagnóstico ou cura, mais sim, o papel de: explorar os potenciais dietéticos que melhoram a saúde; promover

estudos suplementares para a manutenção da saúde e prevenção de doenças crônicas; levantar dados sobre trabalhos científicos sobre os suplementos e controlar a dieta dos suplementos relatados em tratamentos de doenças crônicas (CALIXTO, 2000).

Diante da grande importância dos medicamentos fitoterápicos, vários países da Europa estão intensificando esforços para unificar a legislação referente aos medicamentos fitoterápicos, amplamente comercializados nestes países (em especial na Alemanha e França). Por outro lado, nos Estados Unidos, as preparações à base de plantas são classificadas como suplementos nutricionais, não sendo necessário submeter dados de segurança e eficácia ao FDA para a comercialização destes produtos (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

2.2.1 Legislação brasileira

No Brasil a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) é responsável pelas normas e critérios sobre fitoterápicos e seus registros seguem os mesmos critérios recomendados pela OMS para medicamentos sintéticos.

Segundo o Ministério da Saúde brasileiro (BRASIL, 2001), plantas medicinais “são aquelas que possuem uma história de uso tradicional como agente terapêutico. E o fato de uma planta ter entre seus constituintes precursores químicos de fármacos não necessariamente a caracteriza como planta medicinal. Possuir precursores de síntese não significa que a planta pode ser utilizada na produção de medicamentos”. Os fitoterápicos são definidos como medicamentos cujos componentes terapeuticamente ativos são exclusivamente plantas ou derivados vegetais (extratos, sucos, óleos, ceras, etc.).

A diferença entre planta medicinal e fitoterápico reside no processo de elaboração que a planta sofre. Quando a elaboração privilegia uma formulação específica, é caracterizado como um fitoterápico. De acordo com a Resolução RDC Nº. 48, de 16 de março de 2004, fitoterápico é “todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidades profiláticas, curativas ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade”.

Ocorre também o interesse popular e institucional no sentido de fortalecer a fitoterapia no SUS (Sistema Único de Saúde), uma vez que, depois da década de 80 diversas Resoluções, Portarias e Relatórios foram elaborados com ênfase na questão das plantas medicinais. Algumas delas definem o estudo das plantas medicinais como uma das prioridades de investigação clínica (BRASIL, 2001).

Em 2006, foi publicado o decreto que Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências, que tem o objetivo de garantir à população brasileira o acesso seguro às plantas medicinais e fitoterápicos, promover seu uso racional, o uso sustentável da biodiversidade, desenvolver a cadeia produtiva e a indústria nacional. A Política foi formulada para atender a demandas dos setores públicos e privados e traz importantes contribuições para a indústria farmacêutica, pois promove a utilização de plantas medicinais e fitoterápicos no SUS. A política de fitoterápicos propõe as diretrizes relacionadas: (i) ao fomento à pesquisa, desenvolvimento tecnológico e inovação, (ii) à busca pela garantia da segurança, eficácia e qualidade dos produtos, (iii) à implantação de plataformas tecnológicas com integração de cultivos e produção e (iv) à adoção de Boas Práticas de Fabricação no processo Produtivo (BRASIL, 2004).

A regulamentação de fitoterápicos pode ser dividida em cinco etapas (SIMÕES e col., 2000):

- Etapa botânica: identificação do material de estudo;
- Etapa farmacêutica: preparo da forma farmacêutica para administração, com a garantia de qualidade e uniformidade da amostra, assim como com sua estabilidade durante os testes pré-clínicos e clínicos;
- Etapa de ensaios biológicos pré-clínicos: ensaios farmacodinâmicos, farmacocinéticos e toxicológicos em animais de laboratório;
- Etapa clínica: realizada na espécie humana, está dividida em quatro fases realizadas apenas se existirem indicações seguras de que o benefício do uso medicinal do novo produto suplanta os riscos de uma possível ação tóxica.

Sendo que a toxicologia pré-clínica deve indicar qual o grau de segurança a de um determinado medicamento a ser administrado à espécie humana (SIMÕES e col., 2000).

Em agosto de 1996, a Portaria nº 116 da ANVISA, propôs um roteiro para os estudos toxicidade e eficácia de fitoterápicos, mas apenas em março de 2004, sob forma de Resolução nº 90, foi publicado o “Guia para a Realização de Estudos de Toxicidade Pré-clínica de Fitoterápicos”. Este guia contém os parâmetros para realização de toxicologia pré-clínica e os testes complementares fazem parte desse roteiro (BRASIL, 2004; BRASIL, 1996).

Estão descritos como Complementares os seguintes testes:

- Determinação de efeitos adversos sobre a fertilidade e o desempenho reprodutivo causados por drogas administradas durante a gametogênese e fecundação (uma espécie de mamífero).
- Determinação de efeitos adversos sobre fetos durante a vida intra e extra uterina, por drogas administradas durante a gestação (duas espécies de mamíferos).
- Determinação de efeitos adversos, sobre a mãe e o produto, durante os últimos estágios da prenhez, parto e desenvolvimento pós-natal, por drogas administradas durante este período (uma espécie de mamíferos).

A falta de exigências regulamentares para a entrada dos suplementos alimentares, conduz a brechas na legislação que permitem a entrada e comercialização de muitos produtos que se originam de plantas medicinais.

De acordo com o Decreto-lei brasileiro Nº 986 de 21 de outubro de 1969 (Art. 3), todo suplemento alimentar somente deverá ser exposto ao consumo ou entregue à venda depois de registrado no órgão competente do Ministério da Saúde. Entretanto, o artigo 57 e 58 permitem a entrada no país de alimentos importados em suas embalagens originais, sem registro (BRASIL, 1969). Assim, inúmeros suplementos dietéticos oriundos de outros países, entram no Brasil sem qualquer tipo de controle, podendo ser comercializado como suplemento alimentar ou ainda como fitoterápico.

2.3 *Morinda citrifolia* Linn

2.3.1 Classificação botânica

- Reino: Plantae
- Divisão: Magnoliophyta
- Classe: Magnoliopsida
- Ordem: Gentianales
- Família: Rubiaceae
- Gênero: *Morinda*
- Espécie: *M. citrifolia*
- Nome científico: *Morinda citrifolia* Linn¹.

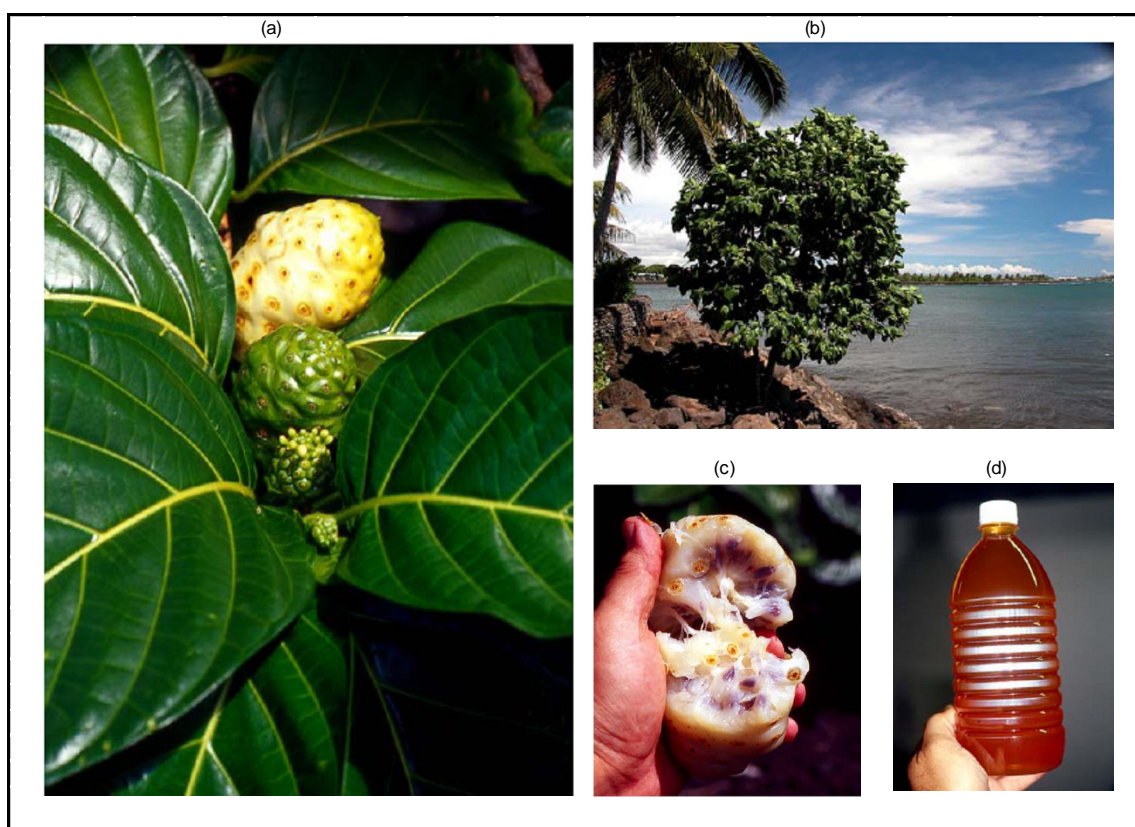


FIGURA 1 – *Morinda citrifolia* Linn

FONTE: REPRODUZIDO POR SCOT, 2003.

NOTA: (a) FOLHAS, FRUTOS VERDES E MADUROS; (b) ARBUSTO EM SEU HABITAT DE ORIGEM; (c) SEMENTES E FRUTO MADURO; (d) SUCO DO FRUTO MADURO DA PLANTA *Morinda citrifolia* Lin

¹ Carolus Linnaeus, (23/05/1707 – 10/01/1778); sueco botânico, físico e zoólogo que classificou a planta *M. citrifolia*, responsável pelos fundamentos do esquema de nomenclaturas da taxonomia moderna.

Popularmente a planta *Morinda citrifolia* é conhecida como: noni, nono, nonu, *Indian Mulberry*, *Ba Ji Tian*, *Cheese Fruit*, *Nhau*, *East Indian Mulberry*, *Mengkudu*, *Awl tree*, dependendo da cultura de cada país e região (SCOT, 2003; WANG e col., 2002).

A *Morinda citrifolia* pertence à família Rubiaceae, possui folhas permanentes de pequeno a médio porte. Trata-se de um arbusto perene que frequentemente cresce em regiões costeiras ao nível do mar e em áreas florestais com cerca de 1 a 500 metros acima do nível do mar. Solos vulcânicos ricos em minerais otimizam seu crescimento, apesar de também se desenvolverem em solos arenosos ou muito úmidos (SCOT, 2003; M^c CLATHEY, 2002).

Os galhos jovens são angulares e observam-se ranhuras (estrias). As folhas são elípticas, opostas e com margens onduladas, possuindo coloração verde brilhante na face superior e opaca na inferior. A inflorescência é composta por pequenas flores brancas e em seguida amarelas com formato tubular. Os frutos são ovóides e tornam-se amarelos ou brancos opalescentes quando maduros (Figura 01). Eles possuem a superfície grumosa coberto de secções com formato poligonal (SCOT, 2003; WANG e col., 2002; McCLATHEY, 2002).

O período de florescência compreende de novembro a fevereiro, sendo as partes utilizadas: frutos, folhas, cascas, tronco e raízes utilizadas pela população em tingimento de tecidos. As partes da planta são coletadas em diferentes épocas do ano. As raízes são coletadas no inverno, os frutos no verão e as folhas na primavera (WANG e col., 2002a).

2.3.2 Histórico da planta *Morinda citrifolia* Linn

A *Morinda citrifolia* Linn é uma planta medicinal popular tradicional que tem sido usada por mais de 2000 anos pelos povos polinésios. A planta tem origem no sudeste da Ásia, e subsequentemente foi distribuída através de vários colonizadores pelas ilhas do pacífico. Os animais e o próprio oceano contribuíram para a difusão da planta pelas ilhas (WHISTLER, 1991 ², citado por McCLATHEY, 2002). Seu cultivo ocorre na Polinésia, Índia, Caribe, regiões centro e norte da América do Sul, locais que oferecem condições adequadas de desenvolvimento para a *M. citrifolia* (DIXON e col, 1999).

² Whistler WA. Polynesian plant introductions. In: Cox PA, Banack AS, eds. *Islands, Plants, and Polynesians*. Portland, Ore: Dioscorides Press; 1991:41-66.

Os derivados da planta são consumidos de diversas maneiras: como alimento, fitoterápico e ainda para tingimento de tecidos. Conforme a medicina tradicional e popular, dentre as enfermidades e afecções mais tratadas encontram-se: alergia, artrite, asma, infecções bacterianas, câncer, diabetes, hipertensão, distúrbios menstruais, musculares, obesidade, úlceras gástricas, dores de cabeça, inibição sexual, insônia, depressão, estresse, problemas respiratórios, AIDS, esclerose múltipla e até dependência de drogas (LAVAUT1 e LAVAUT2, 2003; McCLATCHEY, 2002; WANG e col., 2002a).

O uso popular e o bem estar atribuídos ao noni, faz com que a indústria explore comercialmente os produtos da *Morinda citrifolia*, muitas vezes sem comprovação científica. Existem casos, que evidenciam possíveis propriedades tóxicas do noni, que não podem ser negligenciados. Portanto, o uso deve ser racional a fim de evitar eventos indesejáveis, e que apenas os benefícios dos produtos da planta sejam amplamente explorados no tratamento de doenças e recuperação da saúde.

2.3.3 Composição química

Várias substâncias já foram identificadas através de análises fitoquímicas na *Morinda citrifolia*. A procura se deu por todas as partes da planta, raiz, casca, tronco, galhos, folhas, flores e frutos, sendo que cada constituinte da planta possui uma gama variada de substâncias. Aproximadamente 160 compostos foram identificados nas diversas partes da planta, e a maioria deles pertencem ao grupo dos compostos fenólicos, ácidos orgânicos e alcalóides. Vários estudos fitoquímicos foram conduzidos para esclarecer os componentes da *Morinda citrifolia*, no entanto o painel fitoquímico completo desta planta ainda não é de conhecimento público.

O que realmente surpreende é a quantidade elevada de proteínas contidas no fruto. As proteínas representam 11,3% da matéria seca do suco, e os principais aminoácidos encontrados são o ácido aspártico, ácido glutâmico e isoleucina. Elevada porcentagem de minerais, 8,4% da matéria seca, também é verificada, e os principais são o potássio, enxofre, cálcio e fósforo. As principais vitaminas encontradas no fruto são o ácido ascórbico (158mg/100g matéria seca), e pró-vitamina A. Os compostos fenólicos foram descritos como o maior grupo de

micronutrientes funcionais, e os seguintes compostos foram identificados: damnacanthal, scopoletin, morindone, alizarin, aucubin, nordamnacanthal, rubiadin, rubiadin-1-methyl ether e outros glicosídeos antraquinônicos. Existem também aproximadamente 51 compostos voláteis verificados no fruto maduro incluindo ácidos orgânicos (principalmente ácido hexanóico, octanóico e ácido asperulosídico), álcoois (3-metill-3-buteno-1-ol), ésteres (metil octanoato, metil decanoato), cetonas (2-heptanona) e lactonas (E-6-dodeceno- γ -lactona). Os alcalóides xeronina e proxeronina foram descritos por Heinicke (1985) e Solomon (1999), como constituintes do noni, entretanto a caracterização bioquímica e o método usado para purificação não foram publicados até hoje (CHAN-BLANCO e col., 2006).

2.3.4 Farmacocinética

Em 2002, Wang e col. realizaram experimentos visando avaliar a farmacocinética do suco TAHITIAN NONI® Juice (TNJ). A absorção foi rápida e teve um pico de concentração de 50% em 30 minutos. A concentração plasmática manteve o pico até duas horas após a administração oral de TNJ e o tempo de meia vida da substância escopoletina foi de quatro horas. Após 12 horas apenas 12% de escopoletina permaneceram no plasma e depois de 24 horas apenas 2% restou desta substância na circulação sanguínea. Assim concluíram que a concentração da escopoletina indicou que o noni foi absorvido e encontrado em diferentes tecidos aproximadamente uma hora após a administração. O pico de concentração em diferentes tecidos ocorreu aproximadamente em 3 horas após a administração, com um rápido declínio.

2.3.5 Atividades biológicas reconhecidas

Os povos polinésicos utilizam o noni para o tratamento de diversas desordens na saúde. Algumas delas já possuem sustentação científica, são elas: atividade antibacteriana, antiviral, antitumoral, analgésica, antiinflamatória, imunomoduladora e anti-angiogênica. Uma das atividades mais descritas nos estudos é a atividade antioxidante.

Wang e col. (2001) analisaram a atividade antioxidante do TAHITIAN NONI® Juice (TNJ) *in vitro*. O propósito era avaliar o potencial protetor diante de radicais

livres de oxigênio, que possuem elevada reatividade com lipídios de membrana causando a sua peroxidação (LPO). A atividade antioxidante foi comparada com os da vitamina C, pó de semente de uva e extrato da casca de pinheiro (pycnogenol). A atividade para combater radicais ânions superóxido (SAR) do TNJ mostrou ser 2,8 vezes maior que a vitamina C, 1,4 vezes que o pycnogenol e 1,1 vezes que o pó de semente de uva. Para o estudo da atividade *in vivo* do TNJ foi utilizando o modelo de lesão agudo no fígado através da adição de tetracloreto de carbono (CCl₄) em ratas fêmeas. A adição de 10% de TNJ no bebedouro de água dos animais durante 12 dias foi capaz de reduzir os níveis de radicais ânions superóxido (SAR) e peroxidação lipídica (LPO) para 20% e 50% após três horas da administração de CCl₄, comparado com o grupo controle (WANG e col., 2001).

Zin e col. (2002) investigaram a atividade antioxidante dos extratos das raízes, folhas e frutos da *M. citrifolia*. Os resultados mostraram que extratos não polares das três partes da planta demonstraram possuir alta atividade antioxidante quando comparados com antioxidantes clássicos como o α -tocoferol e di-terc-butil-metil-fenol (BHT).

Em 2005, foram isolados 19 compostos da *M. citrifolia*, que foram avaliados quanto sua atividade antioxidante. Deste total oito compostos demonstraram possuir potente atividade antioxidante: narcissoside, borreriagenin, cytidine, deacetylasperuloside, dehydromethoxygaertneroside, epi-dihydrocornin, methyl α -D-fructofuranoside e methyl β -D-fructofuranoside (SU e col., 2005).

Estudos *in vitro* com a utilização de células placentárias de veias humanas e tumor de mama, indicaram o potencial inibitório da angiogênese. Neste estudo as concentrações de suco 5% e 10% foram capazes de inibir intensamente o crescimento de novas veias e artérias, além de induzirem sua degeneração por apoptose (HORNICK, 2003).

Investigando possível atividade inibitória da enzima cicloxigenase de 24 espécies de plantas australianas e chinesas, Li e col. (2002) demonstraram a atividade inibitória do extrato do fruto sobre a COX-1. A seletividade da inibição da COX-2 versus COX-1 do TNJ *in vitro* foi investigada por SU e col. (2001) e suas atividades foram comparadas com alguns tradicionais antiinflamatórios não esteroidais (AINES), como aspirina, indometacina e um inibidor seletivo da COX-2 o

celecoxibe. Os resultados mostraram que a seletividade para a inibição da COX-2 do TNJ é comparável com aquela do celecoxibe.

Macckoy e col. (2002) demonstraram que o extrato aquoso do suco de noni apresentou atividade antiedematogênica quando administrado tanto por via oral quanto por via intraperitoneal, utilizando o modelo de edema de pata induzido por carragenina. Assim é atribuído ao noni o poder antiinflamatório.

A atividade analgésica do extrato aquoso liofilizado das raízes da *M. citrifolia* foi estudada por Younos e col. (1990), em camundongos. O extrato foi capaz de produzir uma significativa atividade analgésica dependente da dose. Posteriormente, Wang e col. (2002a) examinaram as propriedades analgésicas do TNJ utilizando dois diferentes modelos animais de dor. Os resultados dos estudos mostraram que o TNJ foi capaz de produzir atividade analgésica dose dependente.

A possível ação imunomodulatória foi estudada em modelo de carcinoma pulmonar peritoneal de *Lewis*. A administração terapêutica de TNJ ativou as células do exudato peritoneal e assim aumentou o tempo de sobrevivência dos camundongos. O TNJ ativou o sistema imune do hospedeiro e também foi capaz de estimular a liberação de inúmeros mediadores de células efetoras murine, incluindo fator alfa de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), interferon gama (IFN- γ), óxido nítrico (NO) entre outros (Hirazumi e Furusawa, 1999).

Atkinson (1956) descreveu que o noni inibiu o crescimento de certas bactérias *in vitro*, tais como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus morgani*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella* e *Shigella*. O autor sugeriu que o efeito antibacteriano é devido à presença de antraquinonas como a acubin, L-asperuloside, alizarin, scopoletin entre outras. De maneira semelhante, Locher e col. (1995) demonstraram que um acetoneitrilo extraído do fruto seco do noni inibiu o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Streptococcus pyrogene*. A atividade antitubercular do noni foi descrita por Saludes e col. (2002), naquela ocasião a fração hexano do extrato do noni foi capaz de inibir o crescimento da *Mycobacterium tuberculosis* em 89-95%.

Wang e Su (2001) investigando o efeito preventivo do TNJ sobre a carcinogênese, sugeriram que o suco possui efeito preventivo contra a formação de

tumores originados no DNA celular. Assim concluíram que o TNJ pode contribuir na prevenção de estágios iniciais de câncer.

2.3.6 Estudos Toxicológicos com a *Morinda citrifolia*

2.3.6.1 Toxicidade aguda

O estudo da toxicidade aguda do suco do noni foi realizado pelo laboratório *Eurofins Scientific* a pedido da empresa *International TAHITIAN NONI® juice*. Neste estudo, a dosagem de 15.000 mg/kg não foi capaz de produzir sinais de toxicidade. Também nenhum sinal macroscópico de toxicidade em órgãos pode ser percebido após necrópsia (WANG e col., 2002a).

2.3.6.2 Toxicidade crônica

Em 2001 o laboratório *Scantox Biologisk S/A* realizou o estudo de toxicidade crônica por 13 semanas administrando TNJ via gavagem. Através das análises dos parâmetros: sinais clínicos adversos, consumo de alimento, ganho de massa corporal, massa dos órgãos, exame hematológico e exame microscópico de 55 amostras de tecidos. O suco nas doses: 0,4 mL/kg, 4,0 mL/kg e 8,0 mL/kg, não induziu alterações quando comparados com o grupo controle (WANG e col., 2002).

Complementarmente a própria empresa *International TAHITIAN NONI® juice* realizou um segundo estudo de toxicidade crônica por 13 semanas com o TNJ. A análise dos resultados deste estudo demonstrou que não foram observados efeitos adversos e a NOAEL (*No observed adverse effect level*) foi de 80 mL/kg/dia (WANG e col., 2002).

2.3.6.3 Toxicidade reprodutiva

Matsui e col. (1967) avaliaram o efeito do extrato aquoso da *M. citrifolia* sobre a fertilidade de camundongos Swiss machos e fêmeas. Os animais não apresentaram alterações na libido, no ganho de massa corporal, na fertilidade ou no ciclo estral quando comparados com o grupo controle. De maneira semelhante, não

houve alteração no tamanho da ninhada, nem presença de anormalidades nos descendentes quando comparados com o controle.

A planta de mesmo gênero *Morinda lucida* foi estudada por Raji e col. (2005), que descreveram a ocorrência de prejuízos na contagem, mobilidade, e viabilidade espermática, massa aumentada dos testículos mesmo sem a ocorrência de sinais de toxicidade. Para a maior dose testada (400 mg/kg/dia por 13 semanas) ocorreu o aumento do número de espermatozóides defeituosos e dos níveis séricos de testosterona. Além disso, ocorreu dano considerável nos tubos seminíferos para este mesmo grupo tratado cronicamente.

Muller e col., (2009) investigou os possíveis efeitos adversos do extrato aquoso do fruto da *Morinda citrifolia* sobre a prenhez e parto de ratas progenitoras. A conclusão foi que a exposição ao extrato seco do fruto de noni pode provocar efeitos adversos na gestação de ratos e que as atividades antiestrogênica, antiangiogênica e inibidora da COX-2 podem estar relacionadas a estes efeitos.

2.3.6.4 Estudos teratológicos

O desenvolvimento embrionário é muito sensível a diversos tipos de substâncias químicas, especialmente durante o período da organogênese. Quantidades elevadas de agentes oxidantes podem provocar a exaustão dos mecanismos anti-oxidativos, e provocar danos fetais. Dependendo da extensão dos danos fetais, é possível verificar suas manifestações no período pós-natal através de quadros de malformação (ORNOY, 2007).

Algumas drogas com atividade analgésica podem também possuir mecanismos que provocam danos nos fetos. Estudos utilizando o analgésico paracetamol associado com cafeína, em ratos Wistar indicaram uma elevação na frequência de malformação óssea (BURDAN, 2003).

Os mecanismos teratológicos associados à Talidomida ainda são desconhecidos. A ação anti-angiogênica é evidente, assim acredita-se que este mecanismo possa estar envolvido na produção da malformação (KENYON, 1997).

Existem vários estudos evidenciando possíveis ações teratogênicas de plantas. Neste sentido, para a espécie *Morinda citrifolia*, não foram encontrados estudos científicos sobre a possibilidade de efeitos teratogênicos. Algumas de suas

ações sugerem que seu extrato possa ser teratogênico, uma vez que, a capacidade anti-angiogênica, somada a inibidora da enzima COX, fortalecem a idéia de uma possível ação destrutiva quando administradas na fase organogênica.

2.3.7 Situação regulamentar da *Morinda citrifolia* no Brasil

De acordo com o Decreto-lei brasileiro Nº 986 de 21 de outubro de 1969 (Art. 3), todo suplemento alimentar somente deverá ser exposto ao consumo ou entregue à venda depois de registrado no órgão competente do Ministério da Saúde. Entretanto, o artigo 57 e 58 permitem a entrada no país de alimentos importados em suas embalagens originais, sem registro (BRASIL, 1969). Dessa maneira, inúmeros suplementos dietéticos de diversas origens, podem no Brasil ser comercializados sem qualquer tipo de controle.

No Brasil o suco TAHITIAN NONI[®], e o extrato do fruto da *M. citrifolia*, foram registrados, em 1995, no Ministério da Agricultura e legalmente foi comercializado como suplemento alimentar por vendedores ambulantes e também em farmácias de manipulação. Entretanto, o marketing mundial contempla as propriedades terapêuticas fitoterápicas provocando conflitos regulamentares do ponto de vista legal. Dessa forma o Poder Executivo publicou no dia 30 de abril de 2004, no diário oficial da União, a Resolução RE nº 9, que determina a suspensão em todo território nacional, que durará o tempo necessário à realização de análises e outras providências requeridas, de toda propaganda com alegações de propriedades terapêuticas e/ou medicinais, veiculadas em todos os meios de comunicação, inclusive na internet, do Produto SUCO TAHITIAN NONI (BRASIL, 2004).

Apesar desta resolução emitida pela ANVISA em 2004, o suco do fruto, e também produtos derivados da *M. citrifolia* continuaram a serem comercializados como suplemento alimentar apoiados nas características fitoterápicas, mesmo sem os estudos toxicológicos pré-clínicos e clínicos preconizados pela legislação brasileira.

3. JUSTIFICATIVA

A legislação brasileira possui o propósito de garantir a necessária segurança, eficácia e qualidade dos medicamentos e fitoterápicos, assim como promover o uso racional e a acessibilidade à população (Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006). No entanto existe a crença popular de que produtos naturais não fazem mal, e por isso, fitoterápicos com elevado consumo mundial, como os produtos da *Morinda citrifolia*, são comercializados e consumidos livremente mesmo com a ausência de pesquisas para avaliar a segurança e eficácia exigida pela atual regulamentação brasileira.

Mulheres grávidas fazem parte de uma população que normalmente recorrem ao uso de derivados de plantas para o tratamento de doenças. Esse comportamento pode levar ao consumo inapropriado de produtos naturais que podem ser nocivos ao desenvolvimento embrionário.

Pesquisas realizadas com a *M. citrifolia* demonstram que seus derivados utilizados popularmente possuem atividades que podem estar correlacionadas com prejuízos nos processos de: ovulação, fertilização, implantação, decidualização, parto e formação fetal.

A vasculogênese e angiogênese são etapas críticas de desenvolvimento embrionário e reprodutivo. Portanto, substâncias que atuam de forma inibitória sobre estes processos podem ser eleitas como potenciais teratógenos. Assim como drogas que inibem a ação da enzima COX, que são de maneira geral contra indicadas no período gestacional.

Levando em consideração as propriedades citadas para os derivados da *Morinda citrifolia*, existem evidências reais da necessidade da exploração científica cuidadosa sobre os potenciais efeitos tóxicos sobre a saúde reprodutiva, com a finalidade de direcionar o uso racional dos derivados desta planta *Morinda citrifolia* pelas diversas populações.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar os possíveis efeitos adversos resultantes da administração via oral do extrato seco e do suco do fruto da *M. citrifolia* em ratas fêmeas Wistar (*Rattus norvegicus*) e nos fetos expostos na vida uterina no período crítico de desenvolvimento fetal, a organogênese.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 - Padronização da técnica do ensaio de teratologia no Laboratório de Toxicologia Reprodutiva do Departamento de Farmacologia, Setor Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

2 - Avaliar o comportamento das ratas prenhas quanto a possíveis efeitos tóxicos durante o tratamento nas doses testadas.

3 - Avaliar possíveis alterações externamente visíveis, e no esqueleto de fetos de ratas tratadas com suco e extrato de noni.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos e fêmeas, foram obtidos do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná e mantidos em caixas plásticas padrão com cama de cepilho. Eles foram mantidos em salas com temperatura constante ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), e obedecendo ao ciclo de iluminação claro / escuro de 12 horas (luzes acesas das 7 às 19 horas). Ração (Nuvital[®] para ratos e camundongos de laboratório, Nuvilab Ltda, Curitiba, PR, Brasil) e água foram oferecidos à vontade. Todos os procedimentos realizados com os animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná, sob número: 285.

5.2 ACASALAMENTO

Ratas virgens foram colocadas em contato com machos adultos na fase escura do ciclo para o acasalamento (22 as 8 h), na proporção de três fêmeas para um macho. Na manhã seguinte ao acasalamento foram realizados lavados vaginais para a verificação da presença de espermatozóides. O esfregaço foi realizado com auxílio de uma micropipeta. A abertura vaginal foi lavada superficialmente com 50 μL de solução de cloreto de sódio a 0,9%, e posteriormente, o lavado foi avaliado a fresco em microscopia ótica (aumento 200x). As fêmeas que apresentaram espermatozóides no lavado vaginal foram consideradas prenhas e este foi designado como dia zero de gestação (G0). Após os acasalamentos, as fêmeas prenhas foram separadas randomicamente através da massa corporal em oito grupos de acordo com as doses escolhidas para a realização do protocolo experimental.

5.3 *Morinda citrifolia* e ÁCIDO VALPRÓICO

Foram utilizados neste estudo o extrato ou o suco do fruto da *Morinda citrifolia*, (extrato de noni seco e TAHITIAN NONI[®] Juice), ou também o anticonvulsivante ácido valpróico (Depakene[®]). O suco de noni (98%) e o extrato foram adquiridos da empresa GAMMA COMÉRCIO, IMPORTAÇÃO & EXPORTAÇÃO LTDA, enquanto que o ácido valpróico foi adquirido em farmácia comercial. Suco e extrato foram conservados em embalagens originais protegidos da luz e sob refrigeração, enquanto que o Depakene[®] permaneceu em sua embalagem original apenas protegido da luz. O suco foi concentrado através de liofilização e o resíduo seco foi determinado utilizando uma estufa de laboratório a temperatura de 80°C.

5.4 DOSES UTILIZADAS E TRATAMENTO

As doses de tratamento da *Morinda citrifolia* foram baseadas na dose recomendada para humanos, que é 500 mg/kg/dia para o extrato de noni (GAMMA COMÉRCIO, IMPORTAÇÃO & EXPORTAÇÃO LTDA. NONI, 2007) ou de 30 mL/dia para o suco de noni (VAINO, 2007), considerando um adulto de 70kg. Assim, as doses utilizadas nesta investigação foram: 7, 30 e 300 mg/kg/dia para o extrato ou 0,4, 2,0 e 20,0 mL/kg/dia para o suco, administradas uma única vez ao dia, do sétimo ao décimo quinto dia de gestação, conforme a Tabela 2.

TABELA 2 - GRUPOS DE RATAS TRATADAS DURANTE O PERÍODO DA ORGANOGENÊSE.

Grupo	Dose/Veículo	Via	n
1 Controle veículo	5 mL/kg/dia água	v.o.	15
2 Ácido valpróico	300mg/kg/1mL óleo de canola 5 mL/kg/dia água	s.c./ v.o.	15
3 Suco de noni 0,4	0,4 mL/kg/dia/5 mL água	v.o.	15
4 Suco de noni 2,0	2,0 mL/kg/dia/5 mL água	v.o.	15
5 Suco de noni 20,0	20 mL/kg/dia/5 mL água	v.o.	15
6 Extrato de noni 7	7 mg/kg/dia/5 mL água	v.o.	15
7 Extrato de noni 30	30 mg/kg/dia/5mL água	v.o.	15
8 Extrato de noni 300	300 mg/kg/dia/5 mL água	v.o.	15

Os derivados do noni (extrato ou suco concentrado) tiveram suas massas aferidas e foram diluídos em água destilada como veículo (5 mL/kg) para posterior administração. O grupo controle veículo recebeu apenas o veículo água (5 mL/kg), enquanto o grupo controle positivo para teratogenicidade, ácido valpróico, recebeu via gavagem água e também ácido valpróico 300 mg/kg subcutâneo diluído em óleo de canola (1 mL/kg) .

5.5 CESÁREANAS

As ratas prenhas foram mortas por deslocamento cervical no vigésimo dia de gestação. A pele e a parede abdominal das progenitoras foram incisadas, e o útero exposto. O útero foi removido e teve sua massa aferida, na sequência os fetos foram removidos individualmente. Número de implantes, número de reabsorções foram avaliados e anotados. Foram feitas secções do cordão umbilical, secagem em papel toalha, sexagem, identificação individual e mensuração da massa corporal. A confirmação do número de implantes foi realizada com o auxílio da substância reveladora sulfeto de enxofre.

Os fetos foram identificados e avaliados macroscopicamente quanto a presença de malformações: presença de hemorragia subcutânea, exoftalmia, número de dedos, posição irregular dos membros anteriores, membros posteriores e calda, teste de reflexo (com os dedos puxar os membros posteriores em sentido contrário a cabeça, em direção a cauda, observando o retorno dos membros posteriores a posição inicial), presença de espinha bífida, macrocefalia, microcefalia.

5.6 CLAREAMENTO E COLORAÇÃO ESQUELÉTICA DOS FETOS

Para a análise de alterações esqueléticas os fetos sofreram o processo de diafanização, conforme a técnica modificada de Taylor e Van Dike (1985). Os fetos foram fixados, eviscerados, desidratados, clareados e corados em solução de hidróxido de potássio e alizarina vermelha. Após a obtenção da coloração do esqueleto, os fetos foram conservados em glicerina 100%.

A fixação dos fetos ocorreu em solução de formol a 10% tamponado com fosfato monossódico a 0,4% (NaH_2PO_4) e dissódico a 0,75% (Na_2HPO_4), por uma

semana em frasco tampado. Para otimizar o contato do formol com os tecidos fetais na fixação, os frascos foram agitados pelo menos uma vez ao dia. Após a fixação os fetos foram enxaguados em água corrente e permaneceram em água por 24 horas.

A etapa seguinte foi a retirada das vísceras, realizada com auxílio de pinça curva, através de uma pequena incisão logo abaixo da inserção do cordão umbilical no feto. Também foi realizada a retirada da gordura marrom localizada na região cervical dos fetos. Após a evisceração os fetos foram dispostos em formas de gelo, uma ninhada por forma.

Subsequentemente os fetos foram desidratados inicialmente em álcool 70% por 48 horas. Após este período, os fetos permaneceram em álcool 96% por 24h sendo renovado este reagente no momento 12h.

Após a desidratação os fetos foram submetidos ao processo de clareamento tecidual e coloração óssea na seguinte solução: 2mL de alizarina (0,3% em água) em 1000mL de KOH a 10%. Todas as vezes que a solução de clarificação atingiu coloração marrom a solução foi renovada. Este procedimento foi repetido até que fosse possível visualizar a transparência dos tecidos fetais associados com a coloração das estruturas ósseas esqueléticas. Naquele momento a solução utilizada no clareamento não apresentava mudança na coloração. Durante toda essa etapa, os fetos receberam influência de luz artificial (não solar) e a temperatura ambiente permaneceu em torno de 25°C.

Após a obtenção da coloração ideal para os ossos, os fetos corados foram lavados em água corrente, e permaneceram em água por dois dias. Com a finalidade de aperfeiçoar a transparência dos tecidos epiteliais e permitir a conservação dos fetos durante todo período de análise, os fetos foram mantidos na solução de benzil álcool/glicerina/etanol (1:2:2) por dois dias, e posteriormente em glicerina 100%.

5.7 VARIÁVEIS MATERNAS

Durante o tratamento as fêmeas foram observadas quanto a possíveis sinais de toxicidade relacionada com o tratamento. As massas das fêmeas prenhas foram determinadas diariamente durante o tratamento. As diferenças de massa durante os

períodos G0, G7, G15 e G20 foram expressas através do ganho de massa corporal, modo indireto de avaliação da ocorrência de toxicidade materna.

5.8 VARIÁVEIS FETAIS

Depois do clareamento dos tecidos com KOH e coloração óssea com alizarina vermelha, as alterações esqueléticas foram avaliadas de acordo com o conhecimento adquirido em curso ministrado pela equipe do Laboratório de Toxicologia Ambiental da Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, auxiliadas pelo “ATLAS OF EXTERNAL AND SKELETAL ANOMALIES IN RATS” (CHAHOUUD e FAQI, 1997). Após a primeira leitura, uma amostragem de fetos foi novamente avaliada em conjunto com os técnicos do Laboratório de Toxicologia Ambiental no Rio de Janeiro com a finalidade de confirmar os padrões de resultados obtidos neste trabalho. Discutiu-se também, com este grupo de pesquisadores, o padrão de resultados obtidos.

A terminologia utilizada foi à recomendada pela *International Federation of Teratology Societies* (IFTS) (WISE e col. 1997), sendo que a diferenciação entre forma irregular (sinais de teratogenia) e variações (fenótipo não considerado teratogênico) foi considerada de acordo com o índice de concordância apresentado por Solecki e col. (2001). Assim, manifestações no esqueleto como ausência, fusão, malposicionado, curto, forma irregular, supernumerário, fenda labial e fenda palatina foram consideradas sinais de indução de teratogenicidade.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis que obedeceram à distribuição normal ou homogeneidade entre as variâncias foram comparadas pela análise de variância (ANOVA). As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Tukey. As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram comparadas através do teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para determinar as diferenças entre os grupos.

Nas análises estatísticas duas unidades estatísticas foram assumidas: a porcentagem de fetos e a porcentagem de prenhez. O teste qui-quadrado foi utilizado na comparação entre grupos e apenas as alterações diferentes para as unidades estatísticas porcentagem de fetos e porcentagem de prenhez, simultaneamente, foram consideradas relevantes.

O nível mínimo de significância estatística utilizado foi de 5% ($p < 0,05$), sendo a análise estatística foi realizada com o auxílio do programa *Graphpad Prism*[®] versão 5.0.

7. RESULTADOS

7.1 DADOS DAS CESÁREANAS

As massas dos úteros cheios, a média do número de implantações, a massa fetal, a porcentagem do número de reabsorções e a proporção de fetos machos e fêmeas não diferiram significativamente entre os grupos investigados quando comparadas com o grupo controle veículo ($p < 0,05$) (Tabela 3).

Anormalidades fetais como microcefalia, macrocefalia, exoencefalia, espinha bífida, exoftalmia, polidactilia, posição irregular de membros anteriores e posteriores, entre outras alterações externas visíveis, não foram observadas para nenhum grupo de tratamento do extrato ou do suco de noni. Apenas em uma ninhada, pertencente ao grupo ácido valpróico, houve a manifestação de ausência de cauda. Esta alteração externamente visível manifestou-se nas análises esqueléticas como fusão das vértebras sacrais (S3, S4 e S5), e ausência de vértebras caudais. No entanto, esta alteração não foi capaz de diferir significativamente do controle veículo devido sua baixa frequência (quatro em 130 fetos analisados, Figura 2).

7.2 VARIÁVEIS MATERNAS

No presente estudo não foi verificado morte ou sinais de toxicidade para as ratas tratadas com derivados do noni, assim como, não ocorreram mortes de ratas tratadas com o ácido valpróico. Os dados da Tabela 4 demonstram os ganhos de massa corporal das ratas prenhas durante o período de tratamento (G7 a G15). Neste período os grupos tratados com extrato, suco de noni ou ácido valpróico não diferiram do grupo controle. O ganho de massa corporal durante todo o período gestacional (G0 – G20), também não diferiu os grupos tratados com extrato ou suco de *Morinda citrifolia*, ácido valpróico ou o grupo veículo.

TABELA 3 – DADOS DAS CESAREANAS DE RATAS PRENHAS TRATADAS VIA ORAL COM EXTRATO (7, 30, 300 mg/kg) OU SUCO (0,4; 2; 20 mL/kg) DE *Morinda citrifolia* Linn OU ÁCIDO VALPRÓICO (300 mg/kg) OU VEÍCULO (5mL/kg).

Grupos		Controle Veículo	Extrato			Suco			Ácido Valpróico
Doses		0	7 mg/kg	30 mg/kg	300 mg/kg	0,4 mL/kg	2 mL/kg	20 mL/kg	300 mg/kg
Dados das cesareanas									
Massa do útero + conteúdo (fetos) (g)		64,8 ± 5,91	60,7 ± 3,78	59,61 ± 3,78	70,5 ± 2,96	67,0 ± 2,44	63,45 ± 2,44	66,6 ± 3,53	62,4 ± 5,05
Fetos (ratas prenhas)		96 (9)	114 (11)	83 (8)	111 (10)	129 (11)	99 (9)	115 (10)	111 (13)
Número de Implantações	Total	101	130	89	117	138	107	125	130
	Média de implantações por ninhada	11,1 ± 1,12	11,8 ± 0,711	11,1 ± 0,440	11,7 ± 1,23	12,5 ± 0,877	11,9 ± 0,538	12,5 ± 0,401	12,8 ± 0,553
Reabsorções									
Total		5	16	6	6	9	8	10	21
(n° total de reabsorções /n° total de implantes) x 100		4,9	12,3	6,7	5,1	6,5	7,5	8,0	16,1
% por ninhada		3,92 ± 2,09	11,4 ± 3,65	7,08 ± 4,89	13,8 ± 9,72	5,48 ± 2,45	6,84 ± 2,54	8,37 ± 4,47	13,44 ± 4,75
Massa fetal (g)		3,72 ± 0,108	3,54 ± 0,110	3,54 ± 0,094	3,62 ± 0,131	3,68 ± 0,229	3,68 ± 0,210	3,58 ± 0,189	3,30 ± 0,109
Proporção machos/ fêmeas		45/51	55/59	36/47	55/59	65/64	46/53	54/61	60/51
% machos / % fêmeas		47/53	48/52	43/57	49/51	50/50	46/54	47/53	54/46

NOTA: OS VALORES FORAM APRESENTADOS EM MÉDIA E ERRO PADRÃO DA MÉDIA. AS VARIÁVEIS FORAM ANALISADAS PELO TESTE KRUSKAL-WALLIS SEGUIDAS DA COMPARAÇÃO DE MÉDIAS DE DUNN'S OU PELO TESTE QUI-QUADRADO. FOI ADMITIDO COMO DIFERENÇA SIGNIFICATIVA UM $p < 0,05$.

TABELA 4 – VARIÁVEIS MATERNAS DE RATAS PRENHAS TRATADAS VIA ORAL COM EXTRATO (7, 30, 300 mg/kg) OU SUCO (0,4; 2; 20 mL/kg) DE *Morinda citrifolia* Linn AU ÁCIDO VALPRÓICO (300 mg/kg) OU VEÍCULO (5 MI/kg).

Grupos		Controle veículo	Extrato de noni			Suco de noni			Ácido valpróico
Doses		0	7 mg/kg	30 mg/kg	300 mg/kg	0,4 mL/kg	2 mL/kg	20 mL/kg	300 mg/kg
Ratas prenhas	(n por grupo)	8	11	9	10	11	9	10	13
Massa corpórea materna (g)									
	Dia 0	249 ± 7,66	244 ± 7,17	240 ± 7,04	241 ± 4,35	240 ± 3,87	241 ± 6,25	248 ± 2,75	246 ± 4,31
	Dia 20	338 ± 9,99	317 ± 5,47	308 ± 8,46	323 ± 7,62	319 ± 8,12	323 ± 5,89	315 ± 7,31	329 ± 8,47
Ganho de massa corporal materno (g)									
	Dias 0 - 7	17,3 ± 1,59	13,9 ± 1,81	11,9 ± 1,75	16,9 ± 1,75	15,9 ± 4,31	14,2 ± 2,16	16,1 ± 1,44	17,2 ± 3,02
	Dias 7 - 15	29,1 ± 1,92	26,3 ± 4,01	17,9 ± 3,62	21,2 ± 3,53	18,5 ± 4,14	22,0 ± 2,93	20,6 ± 3,75	26,6 ± 1,98
	Dias 15 - 20	41,9 ± 3,89	40,0 ± 2,85	33,4 ± 4,49	43,3 ± 5,79	42,6 ± 2,86	48,3 ± 3,07	41,2 ± 4,28	46,2 ± 3,50
	Dias 0 - 20	88,4 ± 14,8	80,3 ± 4,48	62,7 ± 9,07	81,3 ± 9,34	76,9 ± 6,45	83,1 ± 7,41	79,4 ± 6,78	90,0 ± 6,36
	Dias 0 - 20 (menos massa (g) útero)	20,0 ± 5,7	19,5 ± 4,61	11,0 ± 3,41	17,6 ± 4,31	10,1 ± 5,96	19,7 ± 7,34	12,7 ± 4,97	25,6 ± 3,92

NOTA: OS VALORES FORAM APRESENTADOS EM MÉDIA E ERRO PADRÃO DA MÉDIA. AS VARIÁVEIS FORAM ANALISADAS PELO TESTE KRUSKAL-WALLIS SEGUIDAS DA COMPARAÇÃO DE MÉDIAS DE DUNN'S. FOI ADMITIDO COMO DIFERENÇA SIGNIFICATIVA UM $p < 0,05$.

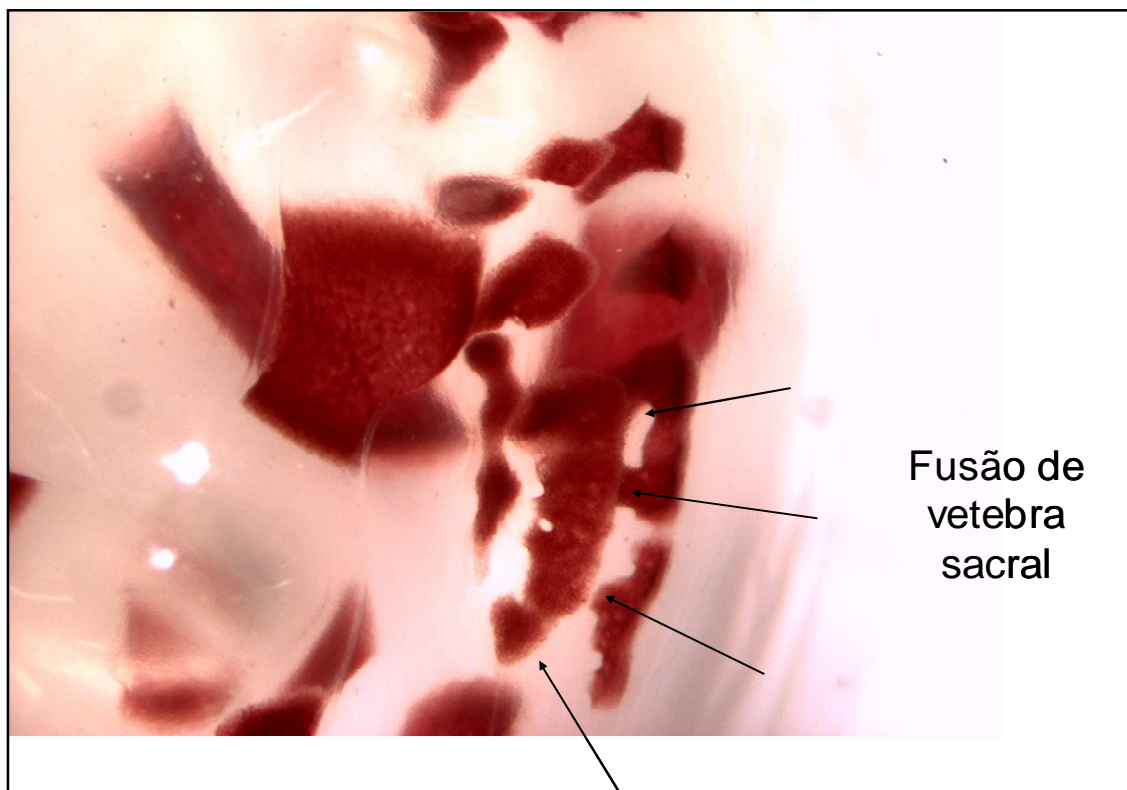


FIGURA 2 – OSSOS SACRAIS FUNDIDOS DE FETOS TRATADOS COM ÁCIDO VALPRÓICO 300 mg/kg/dia (AUMENTO DE SEIS VEZES).

7.2 VARIÁVEIS FETAIS

Para os grupos tratados com extrato 30 mg/kg ou ácido valpróico 300 mg/kg, foi verificado a presença de ossificação retardada nas costelas. No entanto, esta observação foi significativa apenas quando os fetos foram utilizados como unidade estatística, ou seja, a frequência de ratas que manifestaram esta alteração (unidade estatística prenhez), em seus fetos não foi diferente daquela vista no controle veículo.

Nas demais partes esqueléticas dos fetos dos grupos tratados com extrato, ou suco de noni ou ácido valpróico foram verificados ossos que apresentaram retardo de ossificação. Assim, crânio, coluna vertebral, membros anteriores, cintura pélvica e membros posteriores apresentaram sinais de ossificação retardada em pelo menos um osso (Tabela 5).

TABELA 5 – RETARDO DE OSSIFICAÇÃO EM OSSOS FETAIS DE RATAS TRATADAS VIA ORAL COM EXTRATO (7, 30, 300 mg/kg) OU SUCO (0,4; 2; 20 mL/kg) DE *Morinda citrifolia* Linn OU ÁCIDO VALPRÓICO (300 mg/kg).

% de Fetos (ratas prenhas) que apresentaram retardo na ossificação	Controle veículo	Extrato			Suco			Ácido Valpróico
Doses de tratamento	0	7 mg/kg	30 mg/kg	300 mg/kg	0,4 mL/kg	2 mL/kg	20 mL/kg	300 mg/kg
n° fetos (n° mães)	96 (9)	114 (11)	83 (8)	111 (10)	129 (11)	99 (9)	115 (10)	111 (13)
Ossos do Crânio								
Nasal (pobremente calcificado)	0 (0)	15,8*** (45,5)*	2,4 (25)	7,2** (20)	0 (0)	6,1*(44,4)*	15,7*** (40)	14,4*** (53,8)*
Frontal (pobremente calcificado)	1,0 (11,1)	86,0*** (100)***	33,7*** (100)**	49,5*** (90)**	45,0*** (81,8)**	75,8*** (100)***	53,8*** (100)***	34,9*** (84,6)**
Parietal (pobremente calcificado)	13,5 (66,7)	80,7*** (100)	31,3* (100)	54,1*** (100)	55,8*** (100)	73,7*** (100)	64,3*** (100)	69,2*** (100)
Interparietal (pobremente calcificado)	21,9 (100)	84,2*** (100)	47*** (100)	48,6*** (90)	62,0*** (100)	85,9*** (100)	80,0*** (100)	83,6*** (100)
Supraoccipital (pobremente calcificado)	25 (77,8)	15,8 (72,7)	33,7 (100)	18 (70)	18,6 (81,6)	20,2 (77,8)	27,8 (90)	16,4 (38,5)
Timpânico (pobremente calcificado)	0 (0)	31,6*** (72,7)**	13,3*** (75)**	18,9*** (60)*	7,8** (63,6)**	26,3*** (88,9)***	11,3*** (20)	21,9*** (69,2)**
Escamoso (pobremente calcificado)	2,1 (11,1)	14,0** (45,5)	6 (37,5)	9,0* (30)	14,7*** (63,6)	20,2*** (66,7)	18,3*** (50)	8,2 (38,5)
Zigomático (pobremente calcificado)	0 (0)	19,3*** (63,6)**	2,4 (12,5)	8,1** (40)	13,2*** (45,5)	12,1*** (44,4)	21,7*** (60)	11*** (30,8)
Vertebras								
Sacral (pobremente calcificado)	3,1 (11,1)	60,5*** (100)***	51,8** (87,5)***	84,7*** (90)***	43,4* (72,7)***	39,4* (100)***	46,1* (90)***	68,5*** (100)***
Sacral (não calcificado)	1,0 (11,1)	6,1 (27,3)	25,3*** (50)	4,5 (30)	13,2*** (36,4)	26,3*** (88,9)**	4,0*** (40)	3,4 (15,4)
Costelas								
(pobremente calcificadas)	0 (0)	3,5 (27,3)	4,8* (37,5)	2,7 (10)	0,8 (9,1)	3,0 (22,2)	1,7 (20)	6,2* (23,1)

TABELA 5 - CONTINUAÇÃO

Porcentagem de Fetos (ratas prenhas) que apresentaram retardo na ossificação	Controle veículo	Extrato			Suco			Ácido Valpróico
Doses de tratamento	0	7 mg/kg	30 mg/kg	300 mg/kg	0,4 mL/kg	2 mL/kg	20 mL/kg	300 mg/kg
n° fetos (n° mães)	96 (9)	114 (11)	83 (8)	111 (10)	129 (11)	99 (9)	115 (10)	111 (13)
Ossos dos Membros Anteriores								
Humero (pobremente calcificado)	8,1 (55,6)	71,9*** (100)	44,6*** (75)	39,6*** (80)	22,5** (72,7)	41,4*** (100)	76,5*** (100)	61,6*** (92,3)
Radio (pobremente calcificado)	3,0 (33,3)	99,1*** (100)**	62,7*** (87,5)**	78,4*** (80)*	20,9*** (36,4)	61,6*** (88,9)*	67,0*** (90)*	75,3*** (84,6)*
Ulna (pobremente calcificado)	3,0 (33,3)	100*** (100)**	65,1*** (87,5)**	81,1*** (80)*	20,2*** (36,4)	67,7*** (77,8)*	67,7*** (80)*	74,7*** (84,6)**
Dedos								
Metacarpo 1 (pobremente calcificado)	4,0 (33,3)	13,2 (54,5)	47*** (75)	80,2*** (80)*	3,9 (18,2)	11,1* (44,4)*	13,9* (90)**	68,5*** (92,3)**
Metacarpo 1 (não calcificado)	4,2 (33,3)	85,1*** (100)**	0 (0)	2,7 (10)	69,8*** (90,9)*	73,7*** (88,9)*	88,7*** (100)**	6,8 (15,4)
Ossos dos membros posteriores e cintura pélvica								
Ischio (pobremente calcificado)	2,1 (22,2)	91,2*** (90,9)**	61,4*** (87,5)*	84,7*** (80)*	18,6*** (36,4)	68,7*** (88,9)**	80,9*** (100)**	90,4*** (100)**
Ilio (pobremente calcificado)	1,0 (11,1)	91,2*** (90,9)**	60,2*** (87,5)**	80,2*** (80)**	18,6*** (36,4)*	63,6*** (88,9)**	71,3*** (90)**	89,7*** (100)**
Pubis (pobremente calcificado)	0 (0)	91,2*** (90,9)**	59*** (87,5)**	81,1*** (80)**	20,2*** (36,4)*	70,7*** (100)**	68,7*** (90)**	93,8*** (100)**
Femur (pobremente calcificado)	11,5 (33,3)	91,2*** (90,9)*	88*** (100)**	93,7*** (90)*	37,2*** (54,5)*	91,9*** (100)**	96,5*** (100)**	96,6*** (100)**
Dedos								
Metatarsos 1 (não calcificado)	12,5 (33,3)	91,2*** (100)**	72,3*** (100)**	79,3*** (90)**	70,5*** (100)**	80,8*** (88,9)*	89,6*** (100)**	73,3*** (92,3)**

NOTA: OS VALORES FORAM APRESENTADOS EM MÉDIA E ERRO PADRÃO DA MÉDIA. AS VARIÁVEIS FORAM ANALISADAS PELO TESTE QUI-QUADRADO. FOI ADMITIDO COMO DIFERENÇA SIGNIFICATIVA UM $p < 0,05$. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

TABELA 6 – ALTERAÇÕES E VARIAÇÕES DE OSSIFICAÇÃO EM OSSOS FETAIS DE RATAS TRATADAS VIA ORAL COM EXTRATO (7, 30, 300 mg/kg) OU SUCO (0,4; 2; 20 mL/kg) DE *Morinda citrifolia* Linn OU ÁCIDO VALPRÓICO (300 mg/kg) OU VEÍCULO (5 mL/kg).

Porcentagem de Fetos (ratas prenhas) que apresentaram alterações nos ossos	Controle veículo	Extrato			Suco			Ácido Valproico
Doses de tratamento	0	7 mg/kg	30 mg/kg	300 mg/kg	0,4 mL/kg	2 mL/kg	20 mL/kg	300 mg/kg
nº fetos (nº mães)	96 (9)	114 (11)	83 (8)	111 (10)	129 (11)	99 (9)	115 (10)	111 (13)
Ossos do Crânio								
Distancia entre as laminas palatina	0 (0)	34,2*** (100)***	13,3*** (62,5)**	9,9*** (40)**	3,1 (18,2)	21,1*** (77,8)**	29,6*** (90)***	14,4*** (61,5)**
Frontal (forma Irregular)	2,1 (22,2)	9,6* (75)	37,3*** (75)	24,3*** (80)	14,7*** (63,6)	10,1* (55,6)	25,2*** (70)	61*** (100)***
Parietal (forma Irregular)	2,1 (22,2)	0 (0)	19,3** (50)	15,3* (70)	7,0 (45,5)	9,1 (44,4)	7,0 (70)	15,8 (69,2)
Interparietal (fissura)	55,2 (100)	59,6 (90,9)	66,3 (100)	68,5 (90)	62,0 (90,9)	59,6 (100)	61,7 (80)	49,3 (92,3)
Supraoccipital (forma Irregular)	20,8 (77,8)	75,4*** (100)	43,4** (100)	69,4*** (90)	75,4*** (100)	43,4*** (100)	69,4*** (90)	71,2*** (100)
Exoccipital (forma Irregular)	13,5 (66,7)	60,5*** (100)	57,8*** (100)	71,2*** (90)	19,4 (90,9)	16,2 (77,8)	39,1*** (100)	76,7*** (100)
Basoccipital (forma Irregular)	16,7 (77,8)	78,1*** (100)	59,0*** (100)	86,5*** (90)	47,3*** (90,9)	54,5*** (100)	59,1*** (100)	58,2*** (84,6)
Escamoso (forma Irregular)	27,1 (77,8)	76,3*** (100)	63,9*** (100)	77,5*** (90)	48,8*** (100)	70,7*** (100)	60,9*** (100)	67,8*** (100)
Escamoso (orifício)	41,7 (100)	30,7 (81,8)	42,2 (75)	24,3 (60)	35,7 (100)	41,4 (88,9)	16,5 (80)	36,3 (92,3)
Zigomático (forma Irregular)	4,2 (44,4)	34,2*** (81,8)*	10,8 (50)	28,8*** (80)*	20,2*** (72,7)	43,4*** (100)**	14,8* (80)	41,1*** (92,3)**
Palatino (orifício)	2,1 (22,2)	31,6*** (81,8)***	15,7*** (75)*	15,3*** (70)**	4,7 (45,5)	24,2 (77,8)*	22,6 (80)*	31,5*** (84,6)***
Proesfenoide (forma Irregular)	3,1 (33,3)	12,3* (45,5)	7,2 (37,5)	8,1 (40)	12,4 (45,5)	23,2 (77,8)	13,9 (60)	24,7*** (76,9)***
Basisfenoide (fissura)	10,4 (33,3)	28,9** (81,8)	8,4 (25)	10,8 (50)	14,0 (63,6)	25,3** (100)**	48,7*** (80)	35,6*** (84,6)*
Fusão do escamoso com p. jug. maxilar	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2,3 (9,1)	6,1 (22,2)	0 (0)	2,1 (23,1)
Vertebras								
Atlas (forma. Irregular)	24,0 (77,8)	61,4*** (100)	55,4*** (100)	55,9*** (90)	57*** (100)	61,6*** (100)	69,6*** (100)	43,8** (100)
Axis (forma. Irregular)	6,3 (44,4)	8,8 (63,6)	21,7** (62,5)	41,4*** (90)	17,5* (72,7)	20,2** (77,8)	29,6*** (90)	13,7 (53,8)
Cervical 4 (forma. Irregular)	0 (0)	2,6 (27,3)	1,2 (12,5)	0,9 (10)	3,5 (18,2)	6,1* (44,4)	6,1* (40)	1,4 (15,4)
(constricção)	1,0 (11,1)	67,5*** (100)***	74,7*** (100)***	83,8*** (90)**	55,0*** (100)***	73,7*** (100)***	62,6*** (100)***	70,5*** (100)
(descontínua)	0 (0)	0,9 (9,1)	0 (0)	3,6 (10)	2,6 (9,1)	0 (0)	0,9 (10)	0,7 (7,7)
Torácica. (dumbell)	2,1 (22,2)	10,5 (27,3)	6 (50)	0,9 (10)	3,5 (27,3)	5,1 (22,2)	2,6 (30)	18,5*** (84,6)**

TABELA 6 - CONTINUAÇÃO

Porcentagem de Fetos (ratas prenhas) que apresentaram alterações nos ossos	Controle veículo	Extrato			Suco			Ácido Valproico
Doses de tratamento	0	7 mg/kg	30 mg/kg	300 mg/kg	0,4 mL/kg	2 mL/kg	20 mL/kg	300 mg/kg
n° fetos (n° mães)	96 (9)	114 (11)	83 (8)	111 (10)	129 (11)	99 (9)	115 (10)	111 (13)
Costelas								
Torácicas (curta)	19,8 (66,7)	60,5***(100)	44,6***(87,5)	45,9***(90)	5,4 (36,4)	27,3 (88,9)	48,7***(100)	35,6** (100)
(ondulada)	1 (11,1)	10,5 (27,3)	4,8 (25)	8,1 (40)	2,3 (27,3)	8,1*(55,6)	9,6** (20)	8,2* (30,8)
Cervical (direta)	0 (0)	1,8 (9,1)	3,6 (12,5)	0,9 (10)	0 (0)	0 (0)	3,5* (20)	2,7 (30,8)
(esquerda)	0 (0)	1,8 (9,1)	1,2 (12,5)	0,9 (10)	0 (0)	0 (0)	1,7 (20)	5,5*(61,5)**
Esterno								
(deslocado)	8,0 (55,6)	28,9*** (90,9)	21,7* (100)	23,4** (80)	37,2*** (100)	42,4*** (88,9)	33,9*** (90)	39*** (100)*

NOTA: OS VALORES FORAM APRESENTADOS EM MÉDIA E ERRO PADRÃO DA MÉDIA. AS VARIÁVEIS FORAM ANALISADAS PELO TESTE QUI-QUADRADO. FOI ADMITIDO COMO DIFERENÇA SIGNIFICATIVA UM $p < 0,05$. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ ABREVIACÕES: OS.= OSSO; P. JUG.= PROCESSO JUGULAR

Todos os grupos tratados com extrato ou suco de noni apresentaram alterações na ossificação dos ossos do crânio (Figura 3). No entanto, embora os ossos parietais e interparietais, apresentassem retardo de ossificação para a unidade estatística porcentagem de fetos, a frequência de ratas que tiveram fetos que manifestaram esta alteração não foi diferente daquela encontrada no controle veículo. Quanto ao osso nasal, os prejuízos na fixação do cálcio foi notado para as doses de extrato 7 e 300 mg/kg (% de fetos), sendo que apenas a dose 7 mg/kg/dia foi diferente para o número de ninhadas acometidas em relação ao controle veículo. Neste mesmo osso a dose de suco de noni 2 mL/kg, foi capaz de promover interferência na ossificação tanto para a unidade porcentagem de fetos quanto para a unidade rata (prenhez). Os dados também demonstram que o osso zigomático apresentou alteração apenas nos fetos pertencentes ao grupo de ratas tratadas com extrato de noni na dosagem 7mg/kg, nas duas unidades estatísticas analisadas (Tabela 5).

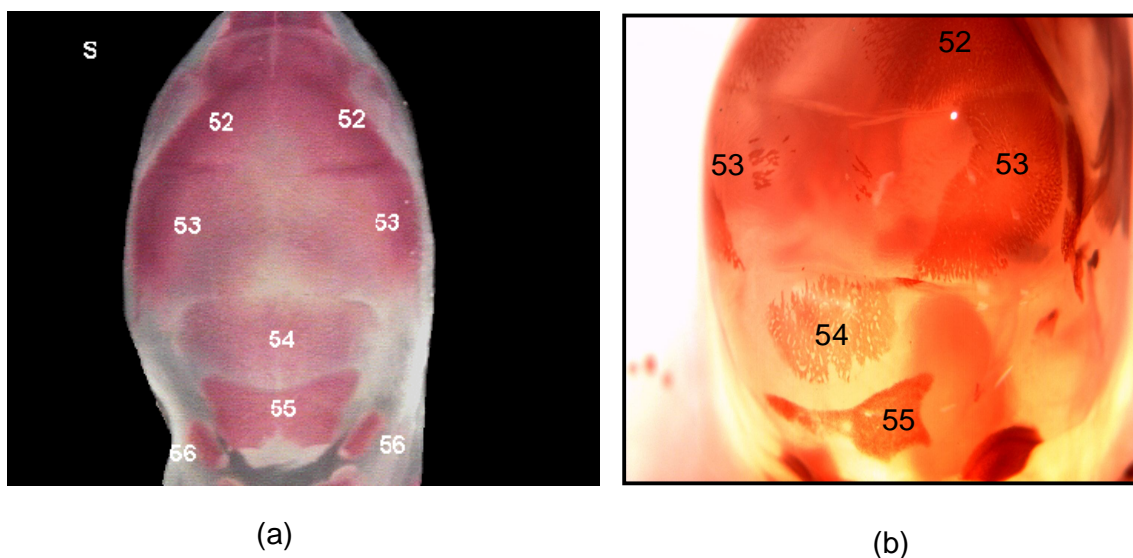


FIGURA 3 – SINAIS DE RETARDO NA OSSIFICAÇÃO NO CRÂNIO, OSSOS POBREMENTE CALCIFICADOS (AUMENTO DE SEIS VEZES).

(a) FETO CONTROLE (CHAHOUD E FAQI, 1997); (b) FETO DE RATA TRATADA COM SUCO DE NONI 2,0 mL/kg/dia. OSSOS (52) FRONTAIS; (53) PARIETAIS; (54) INTERPARIETAIS E (55) SUPRAOCIPITAL.

Os principais ossos do crânio prejudicados quanto à fixação do cálcio vistos em todas as doses de tratamento do extrato ou do suco de noni, foram os ossos frontal e timpânico. Nestes ossos as diferenças entre os grupos tratados com derivados do noni e o grupo controle veículo foram presenciadas em ambas as unidades estatísticas consideradas neste trabalho, % de fetos e a unidade estatística prenhez (Tabela 5).

Para os fetos das ratas tratadas com ácido valpróico os ossos craniais nasal, frontal e timpânico, apresentaram ossificação retardada, as médias foram diferenciadas para as duas unidades estatísticas (fetos e prenhez). Enquanto que para os ossos parietais, interparietais e zigomático, os padrões de resposta foram semelhantes aos grupos de fetos das doses de extrato ou suco de noni (Tabela 5).

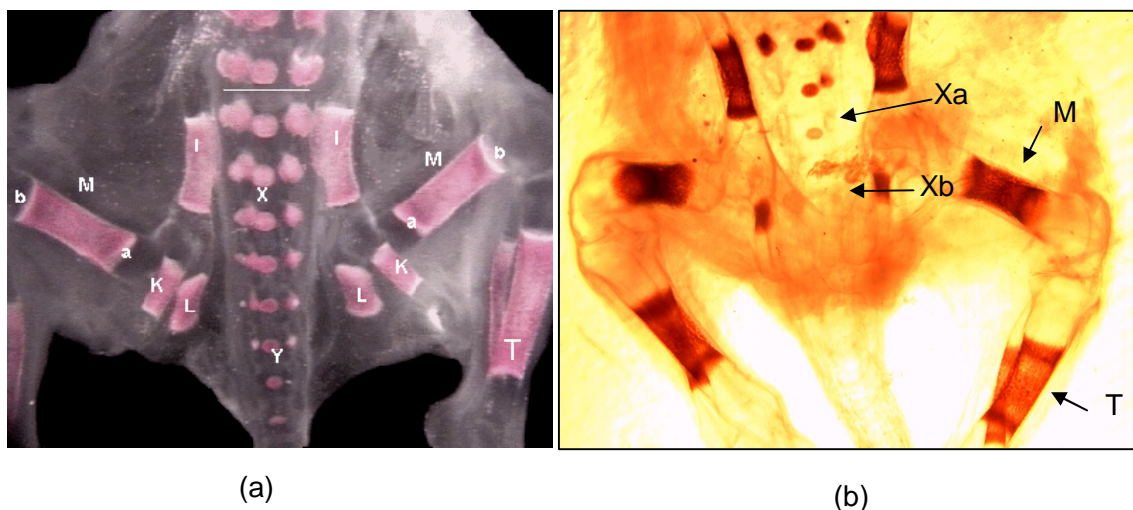


FIGURA 4 - SINAIS DE RETARDO DE OSSIFICAÇÃO DE VÉRTEBRAS SACRAIS, OSSOS DA CINTURA PÉLVICA E MEMBROS POSTERIORES (AUMENTO DE SEIS VEZES).

(a) FETO CONTROLE: M: FÊMUR, I: ISQUIO, K: ÍLIO, L: PUBIS, X: VERTEBRA SACRAL, Y: VÉRTEBRA CAUDAL (CHAHOU D E FAQI, 1997);
(b) FETO DE RATA TRATADA COM SUCO DE NONI 2,0 mL/kg/dia. Xa, M E T: OSSOS COM RETARDO DE OSSIFICAÇÃO; Xb: OSSOS NÃO CALCIFICADOS.

Para a coluna vertebral, os ossos das vértebras sacrais apresentaram dois tipos de alterações (Figura 4). Foram vistos retardo de ossificação, que se

manifestou através da densidade reduzida de coloração nas vértebras, assim como ausência de coloração nas vértebras, ossos não calcificados. A alteração mais freqüente neste estudo foi o retardo de ossificação, que se manifestou em todos os grupos tratados com extrato ou suco de noni, assim como para o ácido valpróico (Tabela 5).

Nos membros anteriores, os dois principais ossos afetados foram o rádio e a ulna. Na ulna foi verificada a ocorrência de prejuízos na ossificação para os fetos de todos os grupos tratados com extrato de noni e para o ácido valpróico, enquanto que para o suco de noni apenas as doses de 2mL e 20mL/kg apresentaram freqüência aumentada para esta alteração (Tabela 5).

Os ossos da cintura pélvica isquio, ílio e púbis, assim como fêmur, fíbula e tíbia dos membros posteriores, também apresentaram sinais de pobre fixação do cálcio (Figura 4). Todos esses ossos apresentaram médias diferentes do grupo controle para as três doses de extrato de noni ou suco de noni, assim como para os fetos provenientes das fêmeas tratadas com ácido valpróico (Tabela 5).

Na Tabela 6 foram representadas as malformações e várias variações esqueléticas encontradas nos fetos expostos durante a vida uterina (intervalo G7-G15), para as doses testadas do extrato ou suco da *Morinda citrifolia* ou do ácido valpróico.

A alteração distância aumentada entre as lâminas palatinas foi encontrada em fetos pertencentes aos grupos tratados com as três doses de extrato de noni ou para as doses 2 mL e 20 mL/kg do suco de noni (Figura 5).

A malformação de forma ou forma irregular também foi vista em ossos do esqueleto fetal. No crânio os ossos supraoccipital, exoccipital, basoccipital e escamoso, apresentaram freqüência de alterações aumentadas significativamente para a unidade estatística feto (% de fetos). No entanto a freqüência de ratas prenhas que apresentaram em seus fetos alterações nestes ossos, não foi diferente daquelas vistas no controle veículo. O único osso que apresentou diferenças estatísticas nas unidades feto e prenhez foi o osso zigomático. Quando comparado com o controle veículo às doses 7, 300 mg/kg de extrato ou a dose 2mL/kg do suco de noni apresentaram índices maiores de alteração de formato do osso zigomático (Tabela 6).

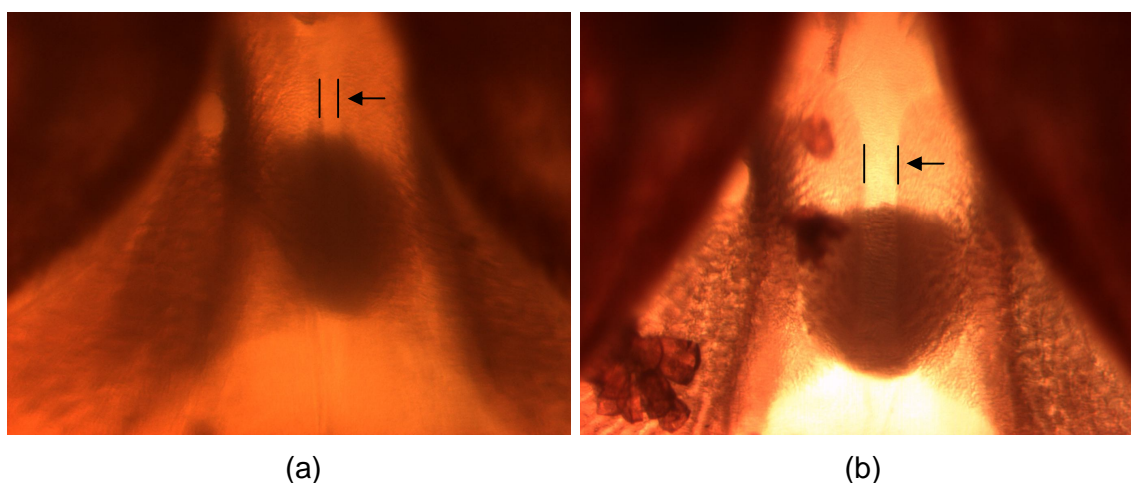


FIGURA 5 - DISTÂNCIA ENTRE AS LÂMINAS PALATINAS AUMENTADAS (AUMENTO DE 20 VEZES).

(a) FETO CONTROLE (b) FETO DE RATA TRATADA COM SUCO DE NONI 2,0 mL/kg/dia.

As alterações de forma encontradas nas demais partes do esqueleto tiveram o mesmo perfil de resposta vista nos ossos do crânio para os grupos tratados com os derivados da *Morinda citrifolia*, os tratamentos que exibiram diferenças entre os fetos não exibiram alteração na frequência de aparecimento na prenhez (Tabela 6).

Na quarta vértebra cervical foi verificada a presença da alteração constrição para os fetos de ratas tratadas com as três doses de extrato de noni ou as três doses de suco de noni. A constrição da vértebra cervical foi estatisticamente diferente para os fetos e para frequência de ninhada acometida (Tabela 6).

Para o grupo tratado com o ácido valpróico, também foi verificado o aumento da distância entre as lâminas palatinas, alterações nos formatos dos ossos do crânio: frontal, zigomático, pré-esfenóide. Assim como ossificação da vértebra central não fusionada completamente em vértebra torácica (dumbell), costela extra na sétima vértebra da coluna cervical e esterno desalinhado (deslocado) (Tabela 6).

8. DISCUSSÃO

Devido à crença de que produtos naturais não causam efeitos adversos, é comum a utilização de produtos como os chás, sucos e fitoterápicos pelas gestantes como recurso medicamentoso, para fins de aliviar sintomas ou curar doenças. A grande maioria dos produtos derivados de plantas utilizados no Brasil não possui estudos pré-clínicos de toxicidade reprodutiva. Plantas não são destituídas de substâncias tóxicas e a algumas delas são atribuídos efeitos teratológicos (MONTANARI, 2002; MELLO e col., 2005).

Apesar da literatura científica sobre a *Morinda citrifolia* ser extensa e contemplar em seus conteúdos os possíveis efeitos farmacológicos e usos terapêuticos, a quantidade de publicações que avaliaram sua segurança é limitada (WEST et al., 2006) e testes de segmento II, que avaliam o potencial que substâncias possuem de induzir malformações em animais de laboratório tratados no período da organogênese, para os derivados da *Morinda citrifolia* são praticamente inexistentes.

No desenvolvimento dos estudos de toxicidade, as avaliações das observações esqueléticas são classificadas como variações e malformações. Classificadas como *major* e *minor*, as manifestações de teratogenicidade em humanos incluem malformação em sistemas ou órgãos como: sistema nervoso central, sistema cardiovascular, sistema urogenital, sistema gastrointestinal, esqueleto entre outras, sendo que muitas delas são capazes de inviabilizar a vida, ou requerem a intervenção cirúrgica ou ainda provocam deficiência física severa (malformações *major*). A *minor* não representa importância clínica maior na vida do indivíduo. Enquanto que as malformações *major* são focadas em estudos clínicos e laboratoriais por poder inviabilizar a vida ou por provocarem alterações irreversíveis. Apesar de existir classificação, pouco se conhece a respeito das causas das malformações congênitas (teratologia). Mesmo com as descobertas de teratógenos causadores de malformações como raios ionizantes, ou vírus da rubéola, ou drogas como a talidomida os mecanismos de teratogenia, assim como os métodos de prevenção ainda precisam ser mais bem estudados (KALTER, 2003). Aproximadamente 3% das crianças nascidas possuem uma ou mais malformações congênitas significantes ao nascimento, e ao final do primeiro ano pós-natal cerca de

3% ou mais possuem sérios prejuízos no desenvolvimento. Destes, se estima que 20% são causas de transmissão genética, 10% são atribuídos a fatores ambientais, e 70% são de causas desconhecidas (US EPA, 1996).

Na tentativa de elucidar e aumentar os conhecimentos a respeito de substâncias teratogênicas o homem se utilizou de animais em suas experimentações. Os primeiros ensaios enfocando a teratologia foram conduzidos em coelhos (HIPPEL, 1907 citado por KALTER, 2003) e em seguida camundongos e ratos foram utilizados (KALTER, 1968). A indução de malformações experimentalmente em animais muitas vezes são consistentes com aquelas verificadas em humanos, como por exemplo, a indução de fenda labial em camundongos pelos corticoides (PARK-WYLLIE e col., 2000). No entanto é possível verificar que algumas substâncias capazes de induzir teratogenia em humanos, podem não induzir malformação em animais como é o caso da droga talidomida, que para ratos não foi capaz de induzir teratogenia (SCOTT e col., 1977), mas em humanos provocava a focomelia.

Antes do desastre da talidomida, os estudos com animais não eram bem definidos, assim muitos medicamentos foram registrados apenas com testes de teratologia realizados em apenas um espécime de animal. Desta maneira por mais que existam semelhanças entre animais de laboratório e humanos, existem também diferenças entre suas fisiologias e isso faz com que não seja possível atribuir a uma substância a capacidade teratogênica apenas com estudos realizados com animais de laboratório (KALTER, 2003). No entanto, estudos bem conduzidos com animais, seguindo os guias de ensaios de segmento II estabelecidos pela US EPA, é possível prever os potenciais tóxicos e os possíveis riscos que as substâncias podem proporcionar aos seres vivos e desta maneira, através da aplicação dos princípios da precaução, é possível evitar que eventos malformações fetais em humanos ocorram.

O presente estudo demonstrou que a exposição pré-natal de fetos ao extrato ou suco de noni ou também do ácido valpróico foi capaz de produzir retardo na ossificação fetal. Ossos com o perfil de retardo foram encontrados nas regiões do crânio, coluna vertebral sacral, membros anteriores, cintura pélvica e membros posteriores. Este perfil foi verificado para cada unidade fetal, assim, pelo menos um osso de cada parte do esqueleto foi acometido com retardo na ossificação.

De acordo com os estudos tradicionais em teratologia um mesmo tipo de manifestação deletéria em fetos pode ser notado em diferentes espécies animais. No entanto, muitos questionamentos são feitos a respeito das interpretações das ocorrências de formato anormal, formato variante e retardo na ossificação. Há consenso a respeito da manifestação de retardo na ossificação de fetos. Quando submetidos ao processo de coloração com alizarina vermelha este tipo de comportamento ósseo pode ser visto através de três manifestações: deficiência na homogeneidade, redução geral da densidade e redução da área corada. Para ratos a manifestação de sinais de ossos incompletos, pobremente calcificado ou osso não ossificado são indicações de retardo de ossificação para o esqueleto fetal. Quando ocorrem sinais de retardo nos ossos dos membros posteriores (tarsos, metatarsos, falanges) ou na região sacral da coluna vertebral, a sincronia de ocorrência de retardo nos demais ossos do esqueleto é particularmente importante, uma vez que, a formação e calcificação dos ossos dos membros posteriores e sacral da coluna vertebral permanecem em estágios de formação fetal próximo ao período do parto (ARIYUKI e col, 1982; ALIVERT e col, 1979).

Para Solecki e col. (2001) a presença de apenas um osso pobremente calcificado em todo esqueleto como sinal de indução de retardo na ossificação fetal, pode ser equivocado na avaliação das substâncias. Assim, a associação de retardo de ossificação nas dos membros posteriores com outros ossos do esqueleto torna-se importante para a afirmação de ocorrência de retardo de ossificação fetal. Desta maneira, em experimentos com animais de laboratório o tratamento é capaz de induzir retardo de ossificação, quando vários ossos de um mesmo feto apresentam sinais de retardo. Este padrão de resposta à ossificação retardada foi visto nos fetos animais de ratas tratadas com extrato ou suco de noni.

Quanto as massas fetais, os resultados indicaram que as massas fetais não diferiram para as doses extrato de noni, suco de noni ou ácido valpróico. A ocorrência de ossos incompletos quando acompanhada com baixas massas fetais ou outros sinais de alterações na calcificação de outros ossos espalhados pelo esqueleto agregam significado aos resultados (CHAHOUUD e PAUMGARTTEN, 2005). A redução das massas fetais nem sempre é acompanhado de retardo de ossificação. Para ninhadas com grande número de fetos, as massas fetais podem ser relativamente menores, mas nas análises esqueléticas podem apresentar

padrões de calcificação iguais encontrados em fetos de maior massa para um mesmo período gestacional. Assim, esses resultados não compactuaram com as tendências apresentadas em estudos de teratologia que associam estas duas variáveis, pois todas as doses de extrato de noni ou suco de noni ou ácido valpróico apresentaram padrões significantes de ossificação retardada mesmo para aquelas que não apresentaram alteração na massa fetal.

Não foi observado dose dependência nos resultados obtidos neste desenho experimental. Para o extrato do noni, a maioria das variáveis analisadas para retardo de ossificação, assumiu uma dose resposta em curva em “U”, enquanto que o suco de noni demonstrou um padrão de dose resposta em “U” invertido (“∩”). Em avaliações de possíveis drogas teratogênicas o padrão de resposta relacionado com a dose (relação dose efeito) é considerado um perfil importante de resposta para a interpretação de casos (BURDAN e col, 2008), e também boa indicação de que as mudanças anatômicas encontradas foram causadas pela exposição ao agente químico testado (CHAHOU E PAUMGARTTEN, 2009). Embora na toxicologia a relação dose resposta permita caracterizar e predizer quais níveis um organismo pode ser exposto a determinados agentes químicos (NOAEL), nos últimos tempos observa-se a capacidade de algumas substâncias de induzir toxicidade mesmo em dosagens menores que foram consideradas seguras por testes toxicológicos (SHEEHAM, 2006). Mesmo para drogas consideradas indutoras clássicas de teratologia é possível verificar a indução alterações ósseas não dose relacionada para alguns parâmetros ósseos analisados, como é o caso das costelas onduladas para a droga hidroxirúria e núcleos centrais bipartidos da coluna vertebral lombar vista para a droga 5-fluor-2deoxiuridina (CHAHOU E PAUMGARTTEN, 2009). Assim, questionamentos surgiram quanto à relação do aparecimento de efeitos maiores ligados a administração de doses menores. Na avaliação deste experimento, mesmo com os resultados não assumindo padrão de curva resposta crescente com a dose, observou-se a ocorrência de retardo na ossificação do esqueleto. E assim, é possível sugerir que o noni pode exercer ação sobre o período de desenvolvimento fetal induzindo retardo na ossificação.

Para as doses testadas de noni, assim como para o ácido valpróico, não foi observado número reduzido de implantes ou reabsorções pós-implantes aumentados (embriotoxicidade), assim como não foi verificado sinais de toxicidade

materna. Em ratos, o suco do noni provou não induzir toxicidade hepática (WANG e col., 2008), entretanto existem relatos de casos de hepatotoxicidade em humanos. Em pesquisas clínicas, foi atribuída ao produto a capacidade de aumentar as enzimas indicadoras de toxicidade hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) (NDA, 2006). Previamente, vários estudos apontavam para possíveis casos de hepatite, em associação ao consumo do suco do noni (ANDRADA e col., 2007; YÜCE e col., 2006; MILLONIG e col., 2005; STADLBAUER e col., 2005). Substâncias tóxicas para o fígado podem interferir na gestação, uma vez que podem induzir toxicidade materna. Geralmente doses tóxicas para as ratas prenhas podem promover sinais de embriofetalidade e malformação fetal (SOUZA e col., 1997). Existem casos em que retardo na ossificação, redução da massa fetal e aumento de número de reabsorções podem estar associados com drogas sintéticas que causam toxicidade materna (BURDAN, 2004; MANSON e KANG, 1994), sugerindo que os sinais de malformação fetal podem estar relacionados com as ações tóxicas das substâncias sobre a progenitora. A indução de toxicidade fetal não associada a toxicidade materna, sugerem que as alterações ou malformações possam estar somente relacionadas com o tratamento. Neste experimento o retardo de ossificação observado não foi associado com a toxicidade materna, desta maneira, os resultados obtidos para o retardo de ossificação podem estar relacionados com o tratamento.

Em nosso estudo as avaliações das morfologias externas dos fetos após as cesareanas não indicaram alterações externas visíveis (a olho nu) para nenhum dos grupos tratados. Depois dos procedimentos de coloração as variáveis observadas vistos com elevada frequência foram: distância aumentada entre as lâminas palatinas e contração na vértebra cervical.

As drogas que possuem a habilidade de inibir a atividade da enzima ciclooxigenase podem causar danos em fetos expostos durante o período pré-natal através de mecanismos ainda não estabelecidos. Sinais de retardo de crescimento intra-uterino fetal, aumento da incidência de variações esqueléticas fetais são efeitos previamente reportados para drogas inibidoras de COX não seletivas (ibuprofeno, piroxicam, tolmetin) em doses que provocaram toxicidade materna (BURDAN e col., 2008). Sabe-se que o ácido acetilsalicílico é capaz de induzir alterações significativas no esqueleto assim como provocar malformações externas como fenda

labial, fenda palatina, espinha bífida em ratos (COOK e col., 2003). Dentre as alterações esqueléticas significativas a constrição da vértebra cervical assim como a alteração de descontinuidade óssea das vértebras cervicais, para este estudo, são as mais importantes.

Estas informações sugerem que drogas inibidoras de COX não seletivas quando administradas em elevadas doses a ratas prenhas possam induzir alterações externas visíveis, alterações esqueléticas e retardo de ossificação associados com toxicidade materna. Compostos existentes no suco da *Morinda citrifolia* possuem a habilidade de inibir a enzima ciclooxigenase específica (COX 2) (SU e col., 2001) e inespecificamente (LI e col., 2002). Assim, comportamento semelhante das drogas sintéticas (ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, piroxicam, tolmetin) poderia ser observado para o suco ou o extrato do noni. A distância aumentada entre as lâminas palatinas no crânio, pode levar a hipótese da ocorrência da malformação, fenda palatina. No entanto, neste estudo não podemos associar a distância aumentada entre as lâminas palatinas com fenda palatina devido à não visualização deste sinal de teratogenicidade nas análises externas realizada após a cesariana. A constrição cervical verificada nos grupos tratados com noni, também foi verificada para os grupos tratados com ácido valpróico, indicando que este tipo de alteração não é restrito aos inibidores de COX. Por outro lado, a constrição da vértebra lombar encontrada neste estudo, não teve a intensidade comparável com aquela exibida em estudos com o ácido acetilsalicílico. Para o ácido acetilsalicílico, várias vértebras são afetadas intensamente, enquanto para este estudo apenas a vértebra cervical L4 apresentou alteração significativa.

Talvez este resultado possa estar relacionado com as dosagens estabelecidas para este experimento e em doses maiores seja possível verificar a acentuação deste tipo de alteração, uma vez que a frequência aumentou com o aumento de dose para o extrato de noni neste estudo (padrão de dose resposta crescente) (CHAHOU E PAUMGARTTEN, 2009).

Nas análises das estruturas esqueléticas dos fetos, também foram verificadas a ocorrência das manifestações: forma irregular, orifícios e fissuras. A forma irregular de ossos dos fetos é um sinal de teratogenicidade, enquanto que orifícios e fissuras são considerados formas variantes normais dos ossos, ou seja, não são considerados sinais de teratogenicidade (SOLECKI e col., 2001).

No entanto, há controvérsia a respeito da representatividade da expressão forma irregular, pois ela não demonstra a intensidade da alteração observada e pode gerar dúvidas de interpretação de resultados.

Neste estudo se apenas as porcentagens de fetos fossem considerados como unidade estatística, os resultados observados nos fetos de ratas tratadas com extrato ou suco de noni, estes derivados do noni seriam considerados teratógenos para ratos. Mas com a finalidade de verificar a frequência de prenhez afetada com anormalidades, consideramos também a unidade prenhez como unidade estatística. Assim ao comparar-se a frequência de prenhez afetada, é possível verificar que para as doses testadas, o extrato de noni ou o suco de noni não foram capazes de provocar teratogenicidade.

Para os ossos que apresentaram formato irregular, apenas o osso zigomático e o pré-esfenóide apresentaram diferenças significativas em relação ao controle. Existe um consenso de que o aparecimento da forma irregular em osso indica que o tratamento foi capaz de induzir teratogenicidade. Entretanto, com apenas as alterações nos ossos zigomáticos e pré-esfenóide, não é possível caracterizar de forma convincente a indução de teratogenicidade, pois estes resultados não exibiram a relação dose dependência.

No entanto, afirmar que o ácido valpróico foi teratogênico neste estudo não seria errado. Esta droga foi capaz de induzir retardo de ossificação e alterações ósseas esqueléticas. Em ratos o ácido valpróico é capaz de induzir alterações crânio faciais assim como esqueléticas: deleção, fusão e ondulação de costelas (KALTER, 2003). Uma vez que é de conhecimento científico a ação teratogênica do ácido valpróico, os resultados obtidos neste estudo comprovam a sua capacidade teratogênica e que o mesmo se mostrou um adequado controle positivo para este estudo.

Retardo na ossificação dos ossos, sem a presença de outros sinais de toxicidade pré-natal, é comumente observado nas investigações teratológicas, e são reportadas não somente para xenobióticos, mas também, para outros fatores como o como estresse (CHISTIAN, 2001). Estudos com humanos revelaram que o retardo da ossificação no período pré-natal, e logo após o nascimento, predispõe ao desenvolvimento de osteoporose em idades mais avançadas (TOTHILL e HANNAN, 2002). O retardo na ossificação recentemente está sendo classificado como variação

esquelética e, portanto não teria efeitos maiores sobre a vida ou saúde de um indivíduo que manifesta este tipo de sinal esquelético. No entanto, existe o contra argumento que defende a idéia de que mesmo não produzindo efeitos capazes de prejudicar a saúde, ele é capaz de provocar perturbações no desenvolvimento esquelético. Segundo CHAHOUD E PAUMGARTTEN (2009) as malformações fetais ocasionadas por drogas teratogênicas podem ser precedidas pelo aumento de manifestações de variações esqueléticas em doses menores. No entanto os mecanismos envolvidos nas variações esqueléticas e malformações fetais não são necessariamente os mesmos.

Assim sendo, enquanto o conhecimento a respeito das influencias das variações esqueléticas não estiverem bem compreendidas, a melhor atitude a ser estabelecida é o princípio da precaução na tentativa de prevenir as ocorrências de malformação.

As publicações científicas sobre os derivados do noni têm trazido muita controvérsia sobre sua segurança como alimento. Considerando tratar-se de um fitoterápico sem histórico de consumo no país, e a possibilidade de consumo livre sem supervisão profissional, a avaliação de sua segurança deve ser baseada em critérios rígidos. Este trabalho chama a atenção para uma possível interferência no desenvolvimento ósseo que precisa ser aprofundada, sugerindo para estudos futuros a realização de análises de segmento II, levando em consideração um número maior de animais prenhes e doses.

A análise aprofundada e criteriosa dos resultados de ensaios de segmento de fase II conduzidos com animais é necessária para que não ocorram interpretações incorretas. Respostas obtidas com animais são limitadas, mas podem assumir caráter preditivo, desta maneira, os resultados obtidos neste trabalho vêm contribuir ainda mais nos esclarecimentos com relação à segurança dos produtos derivados da *Morinda citrifolia*.

9. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo permitem concluir que:

- A técnica aplicada para a realização do ensaio de teratologia foi validada, uma vez que foi possível detectar as malformações fetais induzidas pelo teratígeno ácido valpróico;
- A exposição aos componentes da *Morinda citrifolia*, extrato ou suco, pode induzir retardo de ossificação nos fetos de ratas Wistar;
- As doses testadas de extrato, suco de noni ou ácido valpróico não foram capazes de induzir toxicidade materna em ratas da linhagem Wistar.

Desta maneira, levando em consideração o princípio da precaução, o consumo de produtos que contenham *Morinda citrifolia* Linn em sua composição durante o primeiro trimestre de gravidez deve ser evitado, até que novos estudos de segurança sejam conduzidos e garantam seu uso adequado.

10. REFERÊNCIAS

ALIVERTI, V.; BONANOMI L.; GIAVINI E, LEONE VG & MARIANI L. The extent of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat. **Teratology**, v. 20, p.237-242, 1979.

ALMEIDA, F. C. G.; LEMONICA, I. P. The toxic effects of *Coleus barbatus* B. on the different periods of pregnancy in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 53-60, 2000.

ALONSO, J. R. Tratado de Fitomedicina: Bases clínicas y farmacológicas. 1. ed. Buenos Aires – Argentina: **ISIS EDICIONES S. R. L.**, 1998.

ANDRADA, J.M.L.-C.; CASTILLA, S.L.; OLVERA, M.D.F.; VIDAL, A.A. Hepatotoxicidad grave associada al consume de Noni (*Morinda citrifolia*). **Revista Española de Enfermedades Digestivas**; v.99, nº. 3, p.179-181, 2007.

ARIYUKI F.; ISHIHARA H.; HIGAKI K. & YASUDA M. A study of fetal growth retardation in teratological tests: Relationship between body weight and ossification of the skeleton in rat fetuses. **Teratology**, v.26, p. 263-267, 1982.

ASCHWANDEN, C. Herbs for health, but how safe are they? **Bull. W.H.O.**, Geneva, v.79, n.7, p.691-692, 2001. Disponível em: <<http://www.who.int/bulletin>> Acesso em: 20 ago. 2007

BRASIL, Ministério de Saúde. **Lei no 8.080 (Lei Orgânica da Saúde), de 19 de setembro de 1998**. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização dos serviços correspondentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília-DF, p. 018055, col. 1, 20 set. 1998.

BRASIL. Ministério de Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Decreto-Lei nº 986, de 21 de outubro de 1969. Institui Normas Básicas sobre Alimentos. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasil, DF, 21 out. 1969, p. 8935, Retificação no D.O.U. de 11 nov. 1969, pág. 9737. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br>>. Acesso em: 15/7/ 2008.

BRASIL. Ministério de Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Decreto nº 5813, de 23 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 jun. 2006. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br>. Acesso em: 15/9/ 2007.

BRASIL. Ministério de Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria nº 116/MS/SNVS, de 8 de agosto de 1996. Proposta de Norma para estudo da Toxicidade e da Eficácia de Produtos Fitoterápicos (anexos I e II). Estabelece o

prazo de 60 (sessenta) dias, a contar da publicação desta Portaria, para que interessados apresentem sugestões, junto à Secretaria de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasil, DF, 12 ago. 1996. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br>. Acesso em: 15/7/2008.

BRASIL. Ministério de Saúde. Agência nacional de Vigilância sanitária (ANVISA). Resolução-RDC Nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 de mar. 2004. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br>. Acesso em: 15/9/2007.

BRASIL. Ministério de Saúde. Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004. Determinar a publicação do "GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS". **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 de mar. 2004. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br>. Acesso em: 15/9/2007.

BRASIL. Ministério de Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 9, de 29 de abril de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 30 abr. 2004. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br>. Acesso em: 15/9/2007.

BRASIL. Ministério de Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 17, de 24 de fevereiro de 2000, revogada pela Resolução-RDC Nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 25 fev. 2000. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br>. Acesso em: 14/1/2008.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência de saúde. **Plantas medicinais e fitoterápicos**: Decreto estabelece política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Notícias 31/07/2006. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/noticias_detalhe.cfm?co_seq_noticia=27844>. Acesso em: 20/8/2007d.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de políticas de saúde. Proposta de política nacional de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos. 1 ed. Brasília – DF: **Ministério da Saúde**, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde, Sistema nacional de informações tóxico-farmacológicas (SINITOX). **Plantas tóxicas no Brasil**. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/sinitox/prognacional.htm>>. Acesso em: 17/8/2007a.

BRASIL. Ministério da Saúde, Sistema nacional de informações tóxico-farmacológicas (SINITOX). **Plantas tóxicas no Brasil**. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/sinitox/comigo-ninguem-pode.htm>>. Acesso em: 17/8/2007b.

BRASIL. Ministério da Saúde, Sistema nacional de informações tóxico-farmacológicas (SINITOX). **Plantas tóxicas no Brasil**. Disponível em: < <http://www.fiocruz.br/sinitox/2004/brasil2004.htm>>. Acesso em: 17/8/2007c.

BURDAN, F. Comparison of developmental toxicity of selective and non-selective cyclooxygenase-2 inhibitors in rats – DFU and piroxicam study. **Toxicology**, v.21, p.12–25, 2005.

BURDAN, F. Developmental toxicity evaluation of ibuprofen and tolmetin administered in triple daily doses to Wistar CRL:(WI)WUBR rats. Birth Defects Res B Dev **Reproductive Toxicology**, v.69: 321–330, 2004.

BURDAN, F. Intrauterine growth retardation and lack of teratogenic effects of prenatal exposure to the combination of paracetamol and caffeine in Wistar rats. **Reproductive Toxicology**, v.17, p. 51–58, 2003.

BURDAN, F.; ROZYLO-KALINOWSKA, I.; SZUMILO, J.; DUDKA, J.; KLEPACZ, K. Cyclooxygenase Inhibitors Affect Bone Mineralization in Rat Fetuses. **Cells Tissues Organs**, v.187, p. 221–232, 2008.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, 2000.

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N.; Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71, S58, 2000.

CHAHOU, I E PAUMGARTTEN, F.J.R. Relationships between fetal body weight of Wistar rats at term and the extent of skeletal ossification. **Brazilian Journal of Medicinal Biological Research**, v.38, p.565-575, 2005.

CHAHOU, I E PAUMGARTTEN, F.J.R. Dose response relationships of rat fetal skeleton variations: Relevance for risk assessment. **Environmental Research**. doi:10.1016/j.envres.2009.07.013. 2009.

CHAHOU, I., KWASIGROCCH, T. E.. **Controlled breeding of laboratory animals**. In: Methods in prenatal toxicology, evaluation of embryotoxic effects in experimental animals (Neubert, D., Merker, H-J., Kwasigroch, T. E., Eds). Pp. 79-91. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 1977

CHAHOU, I.; FAQI, A. S. Skeletal Anomalies in rats. **Institute for Pharmacology and Toxicology of Free University of Berlin**, 1997.

CHAN-BLANCO, Y. E col. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, 2006. Review.

CHRISTIAN, M.S.,. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: Hayes,AW. (Ed.), Principles and Method of Toxicology, fourth ed. **Taylor & Francis, Philadelphia**, p.1301–1381, 2001.

COOK, J.C., JACOBSON, C.F., GAO, F., TASSINARI, M.S., HURTT, M.E., DESESSO, J.M.,. Analysis of the nonsteroidal anti-inflammatory drug literature for potential developmental toxicity in rats and rabbits. Birth Defects part. B **Reproductive Toxicology**, v.68, 5–26. 2003.

DIXON, A.R., MCMILLEN, H., ETKIN, N.L. Ferment this: the transformation of Noni, a traditional Polynesian medicine (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae). **Ecological Botony** v.53, p.51–68,1999.

EPA – **Environmental Protection Agency**. Protocol RTI P. O. Box 12194 research triagle park, NC 27709 RTI-839. 1996 Disponível em: [http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/meetings/2002/march/inuterolactationprotocol.p df](http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/meetings/2002/march/inuterolactationprotocol.pdf). Acesso em: 22 set 2007.

FROHBERG, H. **An Introduction to Research in Teratology**. In: Methods in prenatal toxicology, evaluation of embryotoxic effects in experimental animals (Neubert, D., Merker, H-J., Kwasigroch, T. E., Eds). p. 01-13. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 1977.

GAMMA COMÉRCIO, IMPORTAÇÃO & EXPORTAÇÃO LTDA. NONI (*Morinda citrifolia* Extract). **Citação e referência a documentos eletrônicos**. Disponível em: <http://www.gamma.com.br/noni.htm>. Acesso em: 13 jun. 2007.

HEINICKE, R.M. The pharmacologically active ingredient of Noni. **Bulletin of the National Tropical Botanical Garden**. 1985.

HIPPEL E. U"ber experimentelle Erzeugung von angeborenen Star bei Kaninchen nebst Bemerkungen u"ber gleichzeitig beobachteten Mikrophthalmus und Lidcolobom. **Graefe Arch Ophthalmol**, v.65, p.326– 360, 1907.

HIRAZUMI, A.; FURUSAWA, E. **An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumour activity**. Phytoter. Res., v. 13, 1999.

HORNNICK, C. A.; MYERS, A.; SADOWSKA-KROWICKA, H.; ANTHONY, C. T.; WOLTERING, E. A. Inhibition of angiogenic initiation and disruption of newly established human vascular networks by juice from *Morinda citrifolia* (noni). **Angiogenesis**, v.6, p.143–149, 2003

JORGE, R. M.; LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, A. B.; TAGLIATI, C. A. Evaluation antinociceptive , antiinflammatory, and antiucrogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacol**, v.94, p.93-100, 2004.

KALTER H. Teratology of the Central Nervous System: Induced and Spontaneous Malformations of Laboratory, Agricultural, and Domestic Animals. Chicago, **IL: University of Chicago**; 1968.

KALTER, D. Teratology in the 20th century Environmental causes of congenital malformations in humans and how they were established, **Neurotoxicology and Teratology** ,v.25, p.131–282, 2003.

KELLER K. Herbal medicinal products in Germany and Europe: experiences with national and European assessment. **Drug Information Journal**, 30: 933-948. 1996.

KENYON, M.R.B.; BROWNE, F.; D'AMATO, R. J. Effects of Thalidomide and Related Metabolites in a Mouse Corneal Model of Neovascularization. **Exp. Eye Res.** v.64, p.971-978, 1997

LANCASHIRE, R. J. **Jamaican Fruit and Vegetables**. Department of Chemistry, University of the West Indies Mona Campus, Kingston 7, Jamaica. Disponível em: < <http://wwwchem.uwimona.edu.jm/lectures/fruit.html>>. 15/10/2008.

LAVAUT1, N. E. G.; LAVAUT2, J. A. G. *Morinda citrifolia* Linn.: potencialidades para su utilización em la salud humana. **Revista Cubana de Farmácia**, v. 37, 2003.

LI, G.; YANG, T.; ,YANG, J. Cyclooxygenase-2 increased the angiogenic and metastatic potential of tumor cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 299, 2002.

LOCHER, C. P. e col. Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, 1995.

MANSON JM, KANG YJ. Test methods for assessing female reproductive and development toxicology. In: Hayes AW, editor. Principles and methods of toxicology. **New York: Raven Press**, ed. 3rd,. p. 989–1038, 1994.

MARUO, V. M.; SOARES, M. R.; BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. S.. Embryotoxic effects of *Solanum lycocarpum* St. Hill fruits consumption during preimplantation and organogenesis in rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 25, p.627–631, 2003.

MATSUI, A. S. e col. Effects of Some Natural Products on Fertility in Mice. **Medic. Pharmacology**, v. 16, 1967.

M^cCLATHEY. From Polynesian Healers to Health Food Stores: Changing Perspectives of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). **Integrative Cancer Therapies**, v. 1, n. 2, 2002.

M^cKOY, M. G. e col. Preliminary Investigation of the Anti-inflammatory Properties of an Aqueous Extract from *Morinda citrifolia* (Noni). **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v. 45, 2002.

MEDEIROS, R.M.T.; FIGUEIREDO, A.P.M. DE; BENÍCIO, T.M.A.; DANTAS, F.P.M.; RIET-CORREA, F.. Teratogenicity of *Mimosa tenuiflora* seeds to pregnant rats. **Toxicon**, v. 51, p. 316–319, 2008.

MELLO, F.B.; JACOBUS, D.; CARVALHO, K.; MELLO, J.R.B. Effects of *Lantana camara* (Verbenaceae) on general reproductive performance and teratology in rats. **Toxicon**, v.45, p.459–466, 2005.

MILLONIG, G.; STADLMANN, S. AND WOLFGANG, V. Herbal hepatotoxicity: acute hepatitis caused by a Noni preparation (*Morinda citrifolia*). **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v.17, n^o 4, p.445-447, 2005.

MONTANARI, T.; BEVILACQUA, E. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. on pregnant mice, **Contraception**, v.65, p. 171-175, 2002.

MÜLLER, J. C.; BOTELHO, G. G. K.; BUFALO, A. C. E COL. *Morinda citrifolia* Linn (Noni): *In vivo* and *in vitro* reproductive toxicology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, p.229-233, 2009.

NANA, P.; ASONGALEM, E.A.; FOYET, H.S. ; FOLEFOG, G.N.; DIMO, T. ; KAMTCHOUING, P. . Maternal and developmental toxicity evaluation of *Acanthus montanus* leaves extract administered orally to Wistar pregnant rats during organogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 228–233, 2008.

NDA, Scientific Panel on Dietetic products, nutrition and allergies. Opinion on a request from the Commission related to the safety of noni juice (juice of the fruits of *Morinda citrifolia*). **The EFSA Journal**, v.376, p.1-12, 2006.

NEVES, M. C. M. Plantas medicinais: diagnóstico e gestão. **Brasília: IBAMA**, v.35, p.52, 2001.

OLIVEIRA MGM, MONTEIRO MG, MACAUBAS C, BARBOSA VP, CARLINI EA (1991) Pharmacologic and toxicologic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v.34, p.29–41, 1991.

ORNOY, A. Embryonic oxidative stress as a mechanism of teratogenesis with special emphasis on diabetic embryopathy. **Reproductive Toxicology**, v.24, p.31–41, 2007.

PARK-WYLLIE L, MAZZOTTA P, PASTUSZAK A, et al. Birth defects after maternal exposure to corticosteroids: prospective cohort study and meta-analysis of epidemiological studies. **Teratology**, v.62, p.385– 392, 2000.

RAJI, Y.; AKINSOMISOYE, O. S.; SALMAN, T. M. Antispermato-genic activity of *Morinda lucida* extract in male rats. **Asian Journal of Andrology**, v.7, p.405–410, 2005.

SALUDES, J. P. e col. Antitubercular constituents from the hexane fraction of *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae). **Phytotherapeutic Research**, v. 16, 2002.

SCOT, N. ***Morinda citrifolia* L.** Rubiaceae (Rubiaceae) Coffee family noni (Hawai'i), Indian mulberry (English), lada (Guam, Northern Marianas), nono (Cook Islands, Tahiti), non (Kiribati), nonu, nonu atoni, gogu atoni (Niue, Samoa, Tonga, Wallace, Futuna), nen, nin (Marshall Islands, Chuuk), kesengel, lel, ngel (Palau), kura (Fiji), canary wood (Australia), I (Kosrae), weipwul (Pohnpei), mangal'wag (Yap). **Permanent Agriculture Resources** (PAR), P.O. Box 428, Holualoa, HI 96725 USA. 2003. Disponível em: < <http://www.agroforestry.net> >. Acesso em: 15/9/2007.

SCOTT WJ, FRADKIN R, WILSON JG. Non-confirmation of thalidomide induced teratogenesis in rats and mice. **Teratology**, v.6, p.333 – 335, 1977.

SHEEHAM, D. M. No-threshold dose–response curves for nongenotoxic chemicals: Findings and applications for risk assessment, **Environmental Research**, v.100, p.93–99, 2006.

SIMÕES, C. M. O. e col. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. ed. **Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC**, 2000.

SOLECKI, A.; R.; BURGINB, H.; BUSCHMANN, J.; CLARKD, R.; e col. Harmonisation of rat fetal skeletal terminology and classification. Report of the third workshop on the terminology in developmental toxicology Berlin, 14–16 September 2000. **Reproductive Toxicology**, v.15, p.713–721, 2001.

SOLOMON, N.. The Noni phenomenon. **Direct Source Publishing**. 1999.

SOUZA, C.A.M., CARVALHO, R.R., KURIYAMA, S.N., ARAUJO, I.B., RODRIGUES, R.P., VOLLMER, R.S., ALVES, E.N., PAUMGARTTEN, F.J.R., Study of the embryofeto-toxicity of Crown-of-Thorns (*Euphorbia milii*) latex, a natural molluscicide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, p.1325–1332, 1997.

SOUZA-FORMIGONI, M. L. O.; OLIVEIRA, M. G. M; MONTEIRO, M. G.; SILVEIRA-FILHO, N. G.; BRAZ, S.; CARLINI, E. A.; J. Plantas Medicinais: cura segura? **Ethnopharmacology**, v.34, p.21, 1991.

STADLBAUER, V.; FICKERT, P.; LACKNER, C.; SCHMERLAIB, J.; KRISPER, P.; TRAUNER, M. AND STAUBER, R. E. Hepatotoxicity of Noni juice: **Report of two cases. World Journal Gastroenterology**, v.11, n° 30, p.4758-4760, 2005.

SU, B.; PAWLUS, A. D.; JUNG, H.; KELLER, J. K.; MCLAUGHLIN, J. L.; KINGHORN, D. **Chemical Constituents of the Fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) and Their Antioxidant Activity. Journal Natural Products**, v.68, p.592-595, 2005.

SU, C. e col. Selective COX-2 inhibition of *Morinda citrifolia* (Noni) *in vitro*. The proceedings of the Eicosanoids and other Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Disease. **The 7th Annual Conference, Tennessee, USA, 2001.**

TAHITIAN NONI INTERNATIONAL, **Tahitian NONI: The one good thing.** 2005. Disponível em: <https://www.tahitiannoni.com/brazil/br_portuguese/retail/store/product/23752.html> Acesso em: 22/9/2007.

TAHITIAN NONI. **“The one good thing”**: Independent Consultant. TopNoni® Team. Disponível em: <<http://www.topnoni.com/melhores-produtos/composicao-e- vitaminas.php#composicao>>. 2006. Acesso em: 26/9/ 2007.

TAYLOR, W. R.; VAN DIKE, G. C. Revised procedures for staining and clearing small fishes and others vertebrales for bone and cartilage study. **Cybium**, v. 9, p. 107-119, 1985.

TOPPARI, J. et. al. **Male reproductive health and environmental xenoestrogens.** Environmental Health Perspectives, v. 104, n. 4, p. 741-803, 1996.

TOTHILL, P., HANNAN, W.J.,. Bone mineral and soft tissue measurements by dual-energy x-ray absorptionmetry during growth. **Boné**, v.31, p. 429–496, 2002.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, abril/junho, 2006.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). EPA/630/R-96/009: **Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment.** Washington, 1996.

US EPA. Guidelines for reproductive toxicity risk assessment. **EPA/630/R-96/009**,

VAINO.COM.BR. Suco Tahitian Noni®. **Citação e referência a documentos eletrônicos.** Disponível em:< <http://www.vaino.com.br/produto.htm>>. Acesso em 22/9/ 2007.

VEIGA Jr, V. F. ; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, N°3, p. 519-528, 2005.

WANG, M. Y.; WEST, B. J.; JENSEN, C. J.; NOWICKI, D.; e col. *Morinda citrifolia* (Noni): **A literature review and recent advances in Noni research**. Acta Pharmacologica Sinica, v. 23, n. 12, 2002a. Review.

WANG MY, NOWICKI D, ANDERSON G, SU C, JENSEN J. Protective effects of *Morinda citrifolia* on plasma superoxides (SAR) and lipid peroxides (LPO) in current smokers. **The Proceedings of XIth Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International**. v. 117 16 Jul. 2002b.

WANG, M. Y. e col. Protective effect of *Morinda citrifolia* in carbontetrachloride-induced liver injury model: A light and electron microscopic study. The proceedings of the Eicosanoids and other Bioactive Lipids in Cancer, Inflammatory and Related Diseases. **The 7th Annual Conference**, Tennessee, USA, 2001.

WANG, M. Y.; SU, C. Cancer Preventive Effect of *Morinda citrifolia* (Noni). **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 952, 2001.

WANG, M. Y.; WEST, B. J.; JENSEN, C. J.; NOWICKI, D.; ANDERSON, G. Liver Protective Effects of *Morinda citrifolia* (Noni). **Plant and Foods Human Nutrition**. 2008.

WEST, B. J.; JENSEN, C. J.; WESTENDORF, J. AND WHITE, L. D. A Safety Review of Noni Fruit Juice. **Journal of Food Science**, v.71, 2006.

WHISTLER, W. A. Polynesian plant introductions. In: Cox PA, Banack. Islands, Plants, and Polynesians. **Portland, Ore: Dioscorides Press**, p.41-66, 1991.

WHO - **Organización Mundial de La Salud. Situación regulamentaria de los medicamentos**: uma reseña mundial. Traducción del inglés: Organización Panamericana de la Salud. Washington: OPAS, p. 62, 2001.

WHO – World Health Organization. **Guidelines on the good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants**. Geneva, 2003a.

WHO – World Health Organization. **Traditional medicine**. Fact sheet N°134, 2003b.

WHO – World Health Organization. **WHO monographs on selected medicinal plants VOLUME 1**. Geneva, 1999.

WHO- World Health Organization. Bulletin of the World Health Organization. Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review, Geneva, 1998.

WHO- World Health Organization. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine, **A worldwide review**, Geneva, 2000.

WISE DL, BECK SL, BELTRAME D, e col. Terminology of developmental abnormalities in common laboratory mammals, **Teratology**, v.55, p.249–92, 1997.

YOUNOS, C. e col. Analgesic and Behavioral effects of *Morinda citrifolia*. **Planta Med.**, v. 56, 1990.

YÜCE, B; GÜLBERG, V.; DIEBOLD, J. AND GERBES, A. L. Hepatitis induced by Noni juice from *Morinda citrifolia*: a rare cause of hepatotoxicity or the tip of the iceberg? **Digestion**. v.73 p. 2-3; p.167-70, 2006.

ZIN, Z. M.; ABDUL-HAMID, A.; OSMAN, A. Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. **Food Chemistry**, v. 78, 2002.